

II Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

RESUMOS EXPANDIDOS

00136

Resumos expandidos...

2006

PC-2007.00136



37847-1

pa

As informações contidas neste documento somente
poderão ser reproduzidas com a autorização expressa
do Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1516-781X

Dezembro, 2006

Documentos 276

II Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

Resumos Expandidos

Embrapa Soja
Londrina, PR
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal 231 - 86001-970 - Londrina, PR

Fone: (43) 3371-6000 - Fax: 3371-6100

Home page: www.cnpso.embrapa.br

e-mail (sac): sac@cnpso.embrapa.br

Embrapa	
Unidade:	<i>Ar. Se de</i>
Valor aquisição:	
Data aquisição:	<i>12/02/07</i>
M. N. Fin. - Natureza:	
Fornecedor:	
M. O. CDS:	
Objeto:	<i>Doces</i>
M. R. Reg.:	<i>00136/07</i>

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente:	<i>Alexandre José Cattelan</i>
Secretária executiva:	<i>Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite</i>
Membros:	<i>Alexandre Magno Brighenti dos Santos</i> <i>Antonio Ricardo Panizzi</i> <i>Claudine Dinali Santos Seixas</i> <i>Dionísio Brunetta</i> <i>Ivan Carlos Corso</i> <i>José Miguel Silveira</i> <i>Léo Pires Ferreira</i> <i>Ricardo Vilela Abdelnoor</i>
Supervisão editorial:	<i>Odilon Ferreira Saraiva</i>
Normalização bibliográfica:	<i>Ademir Benedito Alves de Lima</i>
Editoração eletrônica:	<i>Neide Makiko Furukawa</i>
Capa:	<i>Danilo Estevão</i>

1ª edição

1ª impressão (2006): tiragem 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Soja

II Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (2 : 2006: Londrina, PR).

Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2006.

233p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.276)

1. Soja-Pesquisa. 2. Pesquisa agrícola. I. Título. II. Série.

CDD 633.34072

© Embrapa 2006

Agradecimento

Ao Sr. John Bowman, pelo estímulo à área acadêmica e por tornar esta obra possível.

O Sr. John Bowman estagiou na Embrapa Soja entre 1982 e 1983.

Apresentação

A Jornada Acadêmica da Embrapa Soja tem como principal objetivo promover o trabalho desenvolvido pelos estudantes que participam do Programa de Estágio de Complementação Educacional da instituição.

Por meio da Jornada, os participantes conhecem as atividades de estagiários de graduação e pós-graduação e podem perceber a real necessidade de interação entre a comunidade científica e a acadêmica. A Jornada também possibilita experimentar a vivência no mundo científico, pois exige que o estagiário planeje sua participação, desenvolvendo resumos expandidos, pôsteres para exposição pública e uma apresentação oral, sempre com suporte de seus orientadores e do Comitê de Publicações da Embrapa Soja.

A avaliação da segunda edição da Jornada Acadêmica, realizada em agosto de 2006, demonstrou os bons resultados do evento e a satisfação da maioria com sua realização. A Embrapa Soja agradece ao esforço dos estudantes e de seus orientadores, que demonstraram a importância de suas tarefas e expuseram a relevância do aprendizado proporcionado pelo estágio. Um agradecimento, também especial, ao fitopatologista John Bowman, que estagiou na Embrapa Soja entre 1982 e 1983 e hoje é um profissional dedicado a causas sociais em diversos países. Bowman contribuiu substancialmente para a realização das duas primeiras edições do evento, que incluem a publicação de livros de resumos, como este.

Alexandre José Cattelan

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

Sumário

Avaliação da capacidade de complexação da solução do solo comparando sistemas de plantio direto e convencional. Tatiana Marianowski; Maria Josefa Santos Yabe; Júlio Cezar Franchini.	13
Uso de contrastes ortogonais aplicados a dados de controle do pulgão (<i>Aphis gossypii</i> Glover) da cultura do pepino. Tiago Flor de Santana; Silvano César da Costa; Maria Cristina Neves de Oliveira.	19
Balanco energético das culturas de girassol e soja para produção de biocombustível. Paulo Henrique Nardon Felici; Rafael M. e S. Coronato; Décio Luiz Gazzoni; Ricardo Ralisch.	25
Balanco energético na cultura da mamona para a produção de biocombustível. Rafael Machado e Silva Coronato; Paulo Henrique Nardon Felici; Décio Luiz Gazzoni; Ricardo Ralisch.	33
Balanco energético na cultura de canola para a produção de biocombustível. Rafael Machado e Silva Coronato; Paulo Henrique Nardon Felici; Décio Luiz Gazzoni; Ricardo Ralisch.	40
Efeito da localização de armadilhas na captura de percevejos da soja, em sistema de semeadura direta e convencional. Mariana Campona Nonino; Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira; Rosimeire Choucino.	46
Efeito de produtos orgânicos na atividade alimentar de <i>Euschistus heros</i> (F.) e <i>Nezara viridula</i> (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), em vagens de soja. Mariana Campona Nonino; Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira.	53
Efeito de fungicidas misturados à dieta artificial sobre o consumo e digestão de alimento pela lagarta-da-soja, <i>Anticarsia gemmatilis</i> (Hubner). Antonio Alberto dos Santos; Lenita Jacob Oliveira; Daniel Ricardo Sosa-Gomez; Sérgio Henrique da Silva; M. C. Salvador.	59
Processo de criação para peças gráficas. Claudinéia Sussai de Godoy; Gilceana Soares Moreira Galerani; Ana Luisa C. L. Cavalcante.	64
Grau de humificação e estoques de matéria orgânica em sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. Leticia Carlos Babujia; Julio César Franchini; D. M. B. P. Milori; Eleno Torres.	69

Distribuição de carbono e estabilidade de agregados em amostras indeformadas de diferentes sistemas de rotação de culturas em plantio direto. Thalita Aline Silvério Molitor; Eleno Torres; Julio César Franchini.	75
Estoques e origem de carbono em sistemas de rotação de culturas após 20 anos de plantio direto. Thaís Portantiolo Correa Porto; Julio César Franchini; Eleno Torres.	80
Scarabaeoidea em fragmentos florestais, Londrina, PR. Vanesca Korasaki; George Gardner Brown; José Lopes.	86
Macroinvertebrados de solo em fragmentos florestais, Londrina-PR. Vanesca Korasaki; George Gardner Brown; José Lopes; Amarildo Pasini; Sabrina Dionízio Pereira.	92
Caracterização física preliminar da bacia hidrográfica dos Ribeirões dos Cágados e das Abóboras. Mariana Rossi Cardoso; Ivan Rodrigues de Almeida.	98
Análise estrutural do plasmídeo simbiótico de <i>Rhizobium tropici</i> CFN299. Daisy Rickli Binde; Mariangela Hungria; Ligia Maria de Oliveira Chueire; Ismael Hernandez Lucas; Marisa Fabiana Nicolás; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos; Luiz de Paula Gonzaga; Esperanza Martinez-Romero; Fernando Gomes Barcellos; Miriam Francisca da Silva.	102
Diversidade genética baseada no PCR-RFLP dos genes <i>16S-rRNA</i> E <i>recA</i> de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) em solos virgens dos Cerrados. Fábio Plotegher; Iêda Carvalho Mendes; Mariangela Hungria.	106
Criação e organização do banco de dados da coleção de culturas de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas da Embrapa Soja. Susan Higashi; Mariangela Hungria.	112
Sequenciamento genômico e bioprospecção de genes de <i>Rhizobium tropici</i> estirpe PRF 81 (SEMIA 4080) utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro. Fabiana Gisele da Silva Pinto; Ligia Maria de Oliveira Chueire; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos; Marisa Fabiana Nicolás; Luiz Gonzaga; Rangel Celso Souza; Mariangela Hungria.	116
Caracterização morfológica de isolados de rizóbio em feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), no Estado de Santa Catarina. Priscila Stocco; Julio C. P. Santos; Vitor P. Vargas; Diego Pasqualini; Mariangela Hungria.	122
Diversidade de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> isoladas de diferentes leguminosas, com base na análise do gene ribossomal 16S e dos genes de nodulação <i>nodY/KA</i>.	

Pâmela Menna; Jesiane Stefania da Silva Batista; Fernando Gomes Barcellos; Eliane Bangel; Mariangela Hungria.	126
Caracterização da estirpe de <i>Sinorhizobium fredii</i> CPAC 402: provável evento de transferência lateral de genes simbióticos em solos dos Cerrados entre gêneros distintos de rizóbios.	
Jesiane Stefania da Silva Batista; Fernando Gomes Barcellos; Pâmela Menna; Pedro Alberto Ballati; Mariangela Hungria.	132
Transferência horizontal de genes simbióticos de estirpes inoculantes de <i>B. japonicum</i> para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados.	
Fernando Gomes Barcellos; Pâmela Menna; Jesiane Stefânia da Silva Batista; Mariangela Hungria.	139
Avaliação da resistência de genótipos de soja dos grupos de maturação M e N a percevejos sugadores de semente.	
José Perez da Graça; Oriverto Tonon; Lenita Jacob Oliveira; Clara Beatriz Hoffmann-Campo.	145
Patogenicidade e caracterização molecular de <i>Myrothecium roridum</i> Tode Ex Fr., isolado de plantas de soja, algodão e melão.	
Camila N. Lazzarin; José Perez da Graça; Silvana R. R. Marin; Nilson Darlan Vieira; Eliseu Binneck; Maurício Conrado Meyer; Claudine Dinali Santos Seixas; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida.	151
Panorama genômico da estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> CPAC 15, recomendada para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja.	
Leandro Pereira Godoy; Lígia Maria de Oliveira Chueire; Fernando Gomes Barcellos; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos; Luiz de Paula Gonzaga; Marisa Fabiana Nicolás; Rangel C. Souza; Mariangela Hungria.	156
Produção de fitoalexinas e suscetibilidade de diversos genótipos de soja ao tamanduá-da-soja <i>Sternechus subsignatus</i> em casa de vegetação.	
Marcos Zambon Abrão; Clara Beatriz Hoffmann-Campo; Lenita Jacob Oliveira; Antonio Carlos Ferreira Mendes; A. C. B. Oliveira.	162
Tolerância ao <i>Cowpea mild mottle virus</i> e sua concentração relativa em soja.	
Tatiana Mituti; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida.	168
Análise da indução do promotor <i>rd29A</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> em soja após déficit hídrico, através de ensaios histoquímico e fluorimétrico em plantas transformadas com a construção <i>rd29A::GUS</i>.	
Amanda Alves de Paiva Rolla; K. Yamaguchi-Shinozaki; N. Yamanaka; K. Nakashima; José Renato Bouças Farias; Silvana R. R. Marin; C. A. Silveira; S. M. Lugle; M. A. Beneventi; Ricardo Vilela Abdelnoor; A. M. Polizel; Alexandre Lima Nepomuceno.	171

Saturação com marcadores de microssatélites dos grupos J e G nas regiões de ligação dos genes de resistência à ferrugem asiática da soja. Selma dos Santos Pereira; D. C. G. da Silva; N. Yamanaka; L. M. Nogueira; A. L. de L. Passianotto; J. V. M. dos Santos; Carlos Alberto Arrabal Arias; Alexandre Lima Nepomuceno; Ricardo Vilela Abdelnoor.	175
Resistência à ferrugem asiática da soja em genótipos do Japão e do Nordeste da China. André Luiz de Lima Passianotto; L. M. Nogueira; D. C. G. da Silva; Ricardo Vilela Abdelnoor; Alexandre Lima Nepomuceno; N. Yamanaka.	180
Estudos preliminares relacionados ao metabolismo de resistência e tolerância à ferrugem asiática da soja. Livia Maria Nogueira; Clara Beatriz Hoffmann-Campo; André Luiz de Lima Passianotto; J. P. da Graça; M. Z. Abrão; S. dos S. Pereira; D. C. G. da Silva; Alexandre Lima Nepomuceno; Ricardo Vilela Abdelnoor; N. Yamanaka.	186
Análise quantitativa da expressão do gene <i>GmHSP 17.6-L</i> em linhagens de soja resistentes e suscetíveis ao nematóide de galhas, <i>Meloidogyne javanica</i>. Renata Fuganti; M. F. P. da S. Machado; A. M. R. Morales; S. R. R. Marin; Waldir Pereira Dias; João Flávio Veloso Silva; Carlos Alberto Arrabal Arias; José Renato Bouças Farias; Alexandre Lima Nepomuceno.	192
Quantificação relativa da expressão do gene xiloglucana endotransglicosilase em linhagens de soja resistentes e suscetíveis à <i>Meloidogyne javanica</i>. Aguida Maria Rodrigues Morales; E. G. M. Lemos; Renata Fuganti; L. C. Alves; S. R. R. Marin; João Flávio Veloso Silva; Waldir Pereira Dias; Carlos Alberto Arrabal Arias; José Renato Bouças Farias; Alexandre Lima Nepomuceno.	197
Avaliação da eficiência agrônômica de inoculante líquido contendo bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>. Lucas de Cássio Marques; Rubens José Campo.	202
Eficiência agrônômica de inoculante líquido composto de bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>. Lucas de Cássio Marques; Rubens José Campo.	208
Algumas respostas da soja a diferentes disponibilidades hídricas do solo. Rafael Victor; Jeani Delgado Paschoal Moura; José Renato Bouças Farias.	214
Avaliação fisiológica de cultivares de soja submetidas a diferentes condições hídricas do solo. Hugo Ribeiro Borges de Paula; Geraldo Terceiro Correa; José Renato Bouças Farias.	220

Respostas a avaliações agronômicas de cultivares de soja submetidas a déficit hídrico. Vinícios José Dias; José Renato Bouças Farias; Osvaldo Coelho Pereira Neto.	224
--	-----

Respostas morfofisiológicas de plantas transformadas com a construção Rd29: Dreb1A, submetidas ao déficit hídrico. Flávio Ranucci Pinheiro; João Antonio Zeqqui; Alexandre Lima Nepomuceno.	229
---	-----

Avaliação da capacidade de complexação da solução do solo comparando sistemas de plantio direto e convencional

Tatiana Marianowski¹; Maria Josefa Santos Yabe²; Júlio Cezar Franchini³.

¹Acadêmica da UEL; ²Docente UEL; ³Embrapa Soja.

Introdução

Na busca por sistemas de manejo que diminuam a perda de solo e favoreçam o aproveitamento da água, o sistema de plantio direto (PD) pode ser considerado como uma das técnicas mais eficiente de conservação do solo, pois a manutenção da matéria orgânica na superfície do solo dificulta a ação microbiana, em virtude do menor contato com o solo, resultando em uma decomposição mais lenta, afetando diretamente a fertilidade do solo (Roth & Vieira, 1983; Wutke, 1993).

Por sua vez, no sistema de plantio convencional (PC), caracterizado pelo preparo do solo com aração e gradagem, há a incorporação de resíduos vegetais, o que reduz a proteção do solo. O solo descoberto estimula a atividade microbiológica acelerando assim, a mineralização da matéria orgânica (Salinas et al., 1997).

Durante a decomposição e a mineralização dos resíduos vegetais, ocorre liberação de compostos orgânicos hidrossolúveis que, em última análise, são ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Franchini et al., 2001). Esses compostos orgânicos possuem grupos funcionais, principalmente carboxílicos e fenólicos, que participam em várias reações químicas no solo, como a complexação organometálica (Schnitzer, 1991; Franchini et al., 2001, 2003).

O uso de eletrodo seletivo para íons cobre (ESI-Cu), como técnica analítica em estudos de complexação orgânica, na solução do solo, permite estimar a capacidade de complexação dos compostos orgânicos através da quantificação da alteração de atividade de íons Cu^{2+} adicionados, uma vez que

esse metal apresenta as maiores constantes de estabilidade entre os metais presentes na solução do solo, como Ca^{2+} e Mg^{2+} (Martell & Smith, 1995).

Dessa maneira, para o presente estudo, foi utilizado eletrodo seletivo de íons cobre com o objetivo de determinar a capacidade de complexação do carbono orgânico solúvel da solução do solo, em experimento de longa duração, comparando sistemas de plantio direto e convencional.

Materiais e Métodos

Para avaliar o efeito do manejo na capacidade de complexação da solução do solo, foram coletadas amostras na fazenda experimental da Embrapa Soja em Londrina, da camada de 0-10 cm de profundidade, em sistemas de PD e PC de um Latossolo Vermelho distroférrico (Embrapa, 1999).

A solução do solo foi obtida através da agitação do solo e água deionizada na relação 1:1, mantida por 1 h em banho-maria nas temperaturas de 50, 60 e 70°C, centrifugada e filtrada. A capacidade de complexação da solução do solo foi estimada utilizando-se o ESI-Cu.

Resultados

A análise química dos solos reflete os efeitos dos sistemas de manejo com relação aos teores de carbono, pH, nutrientes (Ca, Mg, K) e CTC. Geralmente, ocorre maior acúmulo de carbono, ao longo do tempo, no sistema de PD, em relação ao sistema de PC, o que leva ao aumento da concentração do COS na solução do solo, resultando em maior complexação de metais, como Al, Ca e Mg.

No presente estudo, o carbono orgânico solúvel na solução do solo foi extraído em temperaturas crescentes, entre a temperatura ambiente (25°C) e 70°C. Os resultados indicam maiores teores de carbono orgânico solúvel no PD em relação ao PC, com diferenças aumentadas entre estes em função de temperaturas mais elevadas (Tabela 1).

Nos extratos de solos obtidos nas diferentes temperaturas, foram realizados os estudos de complexação de Cu^{2+} (Figura 1). Os resultados indicam que a

Tabela 1. Concentrações de carbono orgânico solúvel em sistemas de manejo do solo em diferentes temperaturas.

Sistemas	Temperaturas (°C)			
	25	50	60	70
	COS (g L ⁻¹)			
PC	4,7	9,4	58,4	80,2
PD	11,1	18,8	108,8	174,2

atividade de íons Cu^{2+} ($\log_a \text{Cu}^{2+}$) diminuiu proporcionalmente ao aumento da temperatura de extração, sendo este efeito intenso para o solo sob PD, em concordância com os teores de carbono solúvel observados nos extratos. De maneira geral, as soluções dos solos obtidas, tanto para o sistema de PD quanto para o PC, diminuíram a atividade de íons Cu^{2+} .

No entanto, para o PC observa-se este efeito apenas para as temperaturas de 60 e 70°C, estando de acordo com a quantidade de COS extraído nas diferentes temperaturas. Para as temperaturas de 25 e 50°C, as quantidades de COS extraído não foram suficientes para complexar com os íons Cu^{2+} . Por sua vez, no sistema de PD, por apresentar uma quantidade maior de COS para todas as temperaturas, o teor de carbono solúvel extraído foi suficiente para diminuir a atividade de íons Cu^{2+} .

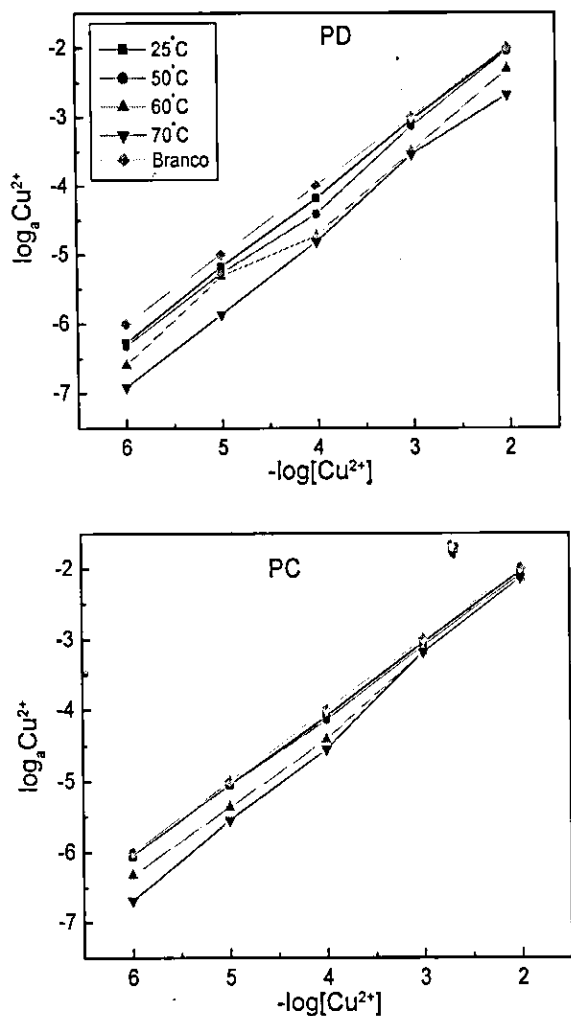


Figura 1. Avaliação da atividade de Ions Cu^{2+} na solução do solo, sob diferentes sistemas de manejo (PD e PC) e temperaturas (25, 50, 60 e 70°C).

Considerações Finais

O aumento da temperatura de extração da solução do solo aumentou a quantidade de COS, intensificando a diferença na capacidade de complexação nos sistemas de manejo do solo.

O sistema de PD apresentou maior diminuição na atividade de íons Cu^{2+} em relação ao PC, indicando maior capacidade de complexação de metais na solução do solo.

O uso do eletrodo seletivo de íons Cu^{2+} , para o estudo de reações de complexação organometálica, auxilia o entendimento das reações nas fases sólida e líquida do solo, bem como na escolha dos sistemas de manejo do solo.

Referências

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412 p.

FRANCHINI, J. C.; GONZALEZ-VILA, F. J.; CABRERA, F.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. Rapid transformations of plant water soluble organic compounds in relation to cation mobilization in an acid Oxisol. **Plant and Soil**, Hague-Netherlands, v. 231, p. 55-63, 2001.

FRANCHINI, J. C.; HOFFMAN-CAMPO, C. B.; TORRES, E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. Organic composition of green manure during growth and its effects on cation mobilization in an acid Oxisol. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 34, p. 2045-2058, 2003.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. Critical stability constants. **NIST Standard Reference Database 46**, Version 2.0, NIST, Gaithersburg, USA, 1995.

ROTH, C.; VIEIRA, M. J. Infiltração de água no solo. **Plantio Direto**, Ponta Grossa, v. 1, n. 3, p. 4, 1983.

SALINAS, J. R.; HONS, F. M.; MATOCHA, J. E. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. **Soil Science Society of America Journal**, v. 61, p. 152-159, 1997.

SCHNITZER, M. Soil organic matter — the next 75 years. **Soil Science**, v. 151, p. 41-58, 1991.

WUTKE, E. B. **Adubação verde**: manejo da fitomassa e espécies utilizadas no Estado de São Paulo. In: WUTKE, E. B.; BULISANI, E. A.; MASCARENHAS, H.A.A. (Ed.) Curso sobre adubação verde no Instituto Agronômico. Campinas: Instituto Agronômico, p.17-29, 1993. (IAC. Documentos, 35).

Uso de contrastes ortogonais aplicados a dados de controle do pulgão (*Aphis gossypii* Glover) da cultura do pepino

Tiago Flor de Santana¹; Silvano César da Costa²; Maria Cristina Neves de Oliveira³. ¹Estudante do curso de Matemática da Universidade Estadual de Londrina - UEL; ²Professor do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada da UEL; ³Pesquisadora da Área de Biometria e Sócio Economia da Embrapa Soja.

Introdução

Em geral, na pesquisa científica, o procedimento é o de formular hipóteses e verificá-las, diretamente, ou através de suas conseqüências. Para tanto, é necessário um conjunto de observações ou dados, e o planejamento de experimentos é, então, essencial para indicar o esquema sob o qual as hipóteses possam ser testadas. Nessa fase, para realizar de forma adequada esses procedimentos, os cuidados vão desde a escolha do tamanho e da forma de parcela, até a definição do delineamento experimental e do método de comparações das médias de tratamentos que comprove as hipóteses agrônômicas e estatísticas (Banzatto & Kronka, 1995; Oliveira, 2005).

A utilização de métodos estatísticos para testar as hipóteses formuladas é devida à presença, em todas as observações, de efeitos de fatores não controlados que causam a variação. Conforme Banzatto e Kronka (1995) tais efeitos, que sempre ocorrem, não podem ser conhecidos individualmente e tendem a mascarar o efeito do tratamento em estudo.

Freqüentemente, face aos resultados de uma pesquisa, deseja-se conhecer, dentre o elenco de tratamentos, aquele que se destacou, de modo que ocorra a indicação do mais eficiente. Existem situações em que alguns delineamentos experimentais mais complexos, como os fatoriais desbalanceados, exigem que os tratamentos sejam comparados entre grupos (Cochran & Cox, 1957). É muito importante a definição do método que irá agrupar esses tratamentos e, dentre os inúmeros métodos existentes, os contrastes ortogonais são indicados para validar tais tratamentos.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi aplicar o método de contrastes ortogonais para avaliar o efeito de tratamentos sobre o controle de pulgões na cultura de pepino, identificando o melhor grupo de comparação.

Desenvolvimento

Os dados utilizados neste trabalho foram obtidos de um estudo de controle de pulgões em cultura de pepino (Banzatto & Kronka, 1995).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram: a) testemunha, b) Azinfós etílico, c) Supracid 40CE dose 1, d) Supracid 40CE dose 2 e e) Diazinon 60CE.

O modelo matemático para o delineamento em estudo é o que segue:

$$Y_{ij} = m + T_i + \varepsilon_{ij}$$

em que:

Y_{ij} é o efeito da variável resposta para o tratamento i e a repetição j ;

m é o efeito da média geral;

T_i é o efeito do tratamento i ;

ε_{ij} é o efeito residual $N \approx (0, \sigma^2)$.

As hipóteses consideradas nesse experimento para comparar os efeitos de tratamento foram:

$H_0 : \sigma_T^2 = 0$, os tratamentos possuem o mesmo efeito;

$H_A : \sigma_T^2 \neq 0$, pelo menos dois tratamentos possuem efeitos diferentes.

O pacote estatístico usado para a análise dos dados foi o 'Statistical Analysis System' - SAS (versão 8.2). Os procedimentos do SAS foram o 'proc means', 'proc univariate' e 'proc glm'.

Os métodos estatísticos utilizados foram a análise exploratória, que avaliou as estatísticas descritivas que, por sua vez, permitiram avaliar as pressuposições requeridas para a realização da análise de variância (ANOVA), e o

teste t, que comparou os efeitos dos contrastes ortogonais. Os testes que permitiram avaliar a normalidade dos resíduos, a aditividade do modelo e a homogeneidade de variâncias foram, respectivamente, o de Shapiro & Wilk (1965), por meio da estatística W, o de Tukey (1949), com a estatística F e o de Burr e Foster (1972), usando a estatística Q.

Resultados

A análise exploratória (Tabela 1) indicou grande variabilidade entre os produtos utilizados para o controle do pulgão, na cultura do pepino (CV=30,73 %). Ainda nessa tabela, observou-se que não foram atendidos todos os requisitos para a realização da ANOVA. O valor do coeficiente de curtose foi maior que zero, os dados não devem ser estudados de acordo com a distribuição normal (Shapiro & Wilk, 1965). As variâncias dos tratamentos indicaram heterogeneidade irregular, em função da grande variação entre a amplitude dos valores dos tratamentos (Burr & Foster, 1972) e o

Tabela 1. Estatísticas descritivas e testes de pressuposições da análise de variância com dados originais e transformados.

Estatísticas descritivas		Dados	
		Originais	Transformados (potência, p=0,229)
Coeficiente de variação		30,7361	6,9583
Coeficiente de assimetria		-0,4167	0,2996
Coeficiente de curtose		3,2428	-0,2534
Shapiro-Wilk:	W	0,8960	0,9746
	Prob (W)	0,0067	0,6711
Não-Aditividade:	F	6,1474	0,1003
	Prob (F)	0,0205	0,7541
Hartley:	valor calculado	155,5980	4,7845
	valor crítico	16,3000	16,3000
Burr-Foster:	valor calculado	0,4952	0,2346
	valor crítico	0,3900	0,3900

modelo não aditivo (Tukey, 1949). Devido a esses resultados, foi utilizada a transformação potência ($p=0,229$), para estabilizar a normalidade dos resíduos, da homogeneidade das variâncias dos tratamentos e da aditividade do modelo. Após o uso da transformação, observaram-se mudanças significativas nos resultados das estatísticas descritivas, o coeficiente de variação foi reduzido ($CV=6,95\%$) e todas as pressuposições para esse modelo matemático foram atendidas (Tabela 1).

Salienta-se que a ANOVA, sem os critérios de independência e normalidade atendidos, pode incorrer a erros e apresentar grupos de contrastes significativos, equivocadamente (Tabelas 2, 3 e 4).

Com base nos resultados da ANOVA, pode-se rejeitar a hipótese de igualdade dos tratamentos ($F=119,90$). Partindo desses resultados, utilizou-se o teste de contrastes ortogonais para avaliar a eficiência dos tratamentos estudados. Pelo método dos contrastes ortogonais, observou-se que houve resposta significativa entre os dois primeiros grupos de contrastes.

Na comparação dos produtos Supracid dose 2 e Diazinon contra a testemunha e Azinfós, o teste t indicou grande significância entre essa comparação ($t=21,72$). No segundo grupo, com a testemunha e o Diazinon contra os tratamentos Azinfós, Supracid doses 1 e 2, a significância foi menor ($t=2,35$). As demais comparações não apresentaram respostas significativas. Outros grupos de contrastes podem ser obtidos para maior compreensão da pesquisa (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 2. Análise de variância para os dados originais e transformados.

Causas de variação	GL	Originais			Transformados		
		Quadrado médio	Teste F	Pr(F)	Quadrado médio	Teste F	Pr(F)
Tratamento	4	5786314,80	81,73	0,0001	10,2113	119,90	0,0001
Resíduo	25	70745,74			0,0851		
Total	29						

Tabela 3. Análise de variância dos contrastes dos ortogonais.

Contrastes	GL	Dados originais			Dados transformados		
		Quadrado médio	Teste F	Pr(F)	Quadrado médio	Teste F	Pr(F)
C ₄ , C ₅ VS C ₁ , C ₂	1	19425660	274,58	0,0001	40,1788	471,78	0,0001
C ₁ , C ₅ VS C ₂ , C ₃ , C ₄	1	3483514,71	49,24	0,0001	0,4689	5,51	0,0272
C ₂ , C ₅ VS C ₁ , C ₄	1	180401,67	2,55	0,1229	0,0533	0,63	0,4360
C ₁ , C ₃ , C ₅ VS C ₂ , C ₄	1	55683,09	0,79	0,3834	0,1441	1,69	0,2052
Total	4						

Tabela 4. Valor das estimativas dos contrastes.

Parâmetros	Dados originais			
	Estimativa	Erro padrão	Teste t	Pr(t)
C ₄ , C ₅ VS C ₁ , C ₂	-5690,00	343,37	-16,57	0,0001
C ₁ , C ₅ VS C ₂ , C ₃ , C ₄	2851,00	406,29	7,02	0,0001
C ₂ , C ₅ VS C ₁ , C ₄	-548,33	343,37	-1,60	0,1229
C ₁ , C ₃ , C ₅ VS C ₂ , C ₄	806,00	908,49	0,89	0,3834
Total	4			

Parâmetros	Dados transformados			
	Estimativa	Erro padrão	Teste t	Pr(t)
C ₄ , C ₅ VS C ₁ , C ₂	-8,18	0,37	-21,72	0,0001
C ₁ , C ₅ VS C ₂ , C ₃ , C ₄	1,04	0,44	2,35	0,0272
C ₂ , C ₅ VS C ₁ , C ₄	0,29	0,37	0,79	0,4360
C ₁ , C ₃ , C ₅ VS C ₂ , C ₄	1,29	0,99	1,30	0,2052

Conclusões

Pelo presente trabalho, conclui-se que:

- coeficientes de assimetria e curtose maiores que zero indicam a presença de variabilidade experimental;
- ausência de normalidade dos erros distorce os resultados do teste de comparação de médias e homogeneidade de variâncias;

- a transformação de dados não deve ser utilizada para reduzir o coeficiente de variação, e sim para transformar os dados, de modo que atendam os requisitos para a análise de variância;
- o estudo de contraste ortogonal é eficiente para comparar grupos de tratamentos.

Referências

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995.

BURR, I. W.; FOSTER, L. A. **A test for equality of variances**. West Lafayette: University of Purdue, 1972. p. 26. (Mimeo series, 282).

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. New York: John Willey 1957. pp. 611.

OLIVEIRA, M. C. N. de. A estatística na pesquisa agrícola. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27., 2005, Cornélio Procopio. **Ata...** Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 134-147. (Embrapa Soja. Documentos, 265). Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Cesar de Castro, Janete Lasso Ortiz, Simone Ery Grosskopf.

SAS Institute (1995), SAS proprietary software release 8.2. Cary, NC.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B., An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, **52**, 1965. 591-611.

TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, **5**, 1949. 232-242.

Balanco energético das culturas de girassol e soja para produção de biocombustível

Paulo Henrique Nardon Felici¹; Rafael M. e S. Coronato²; Décio Luiz Gazzoni³; Ricardo Ralisch⁴. ¹Bolsista de Mestrado UEL / Embrapa Soja; ²Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial - CNPQ; ³Pesquisador, Embrapa Soja; ⁴Professor, Agronomia UEL.

Introdução

Atualmente, existe um crescente interesse da sociedade mundial por fontes alternativas de energia, principalmente aquelas que contribuem para reduzir a emissão de gases de efeito estufa, característica das fontes tradicionais de energia fóssil. O uso de biocombustíveis é visto, hoje, como uma alternativa viável de uso, segundo Urquiaga et al. (2005). Ainda de acordo com o esses autores, pouca atenção vem sendo dada aos estudos de balanço energético, os quais estabelecem a relação entre o total de energia contida no biocombustível e o total de energia investida em todo o processo de produção, incluindo-se as etapas agrícola e industrial.

O balanço energético é o parâmetro mais adequado para definir a viabilidade técnica de um programa de bioenergia. Para ser positivo, o balanço energético depende de diversos fatores, em especial do rendimento da cultura e do menor consumo de fertilizantes nitrogenados, que demanda grande quantidade de energia para sua produção. Assim, alguns dos desafios da pesquisa agropecuária são aumentar a produtividade da cultura e o teor de óleo do grão, bem como promover a utilização da adubação verde e a fixação simbiótica como fonte de N.

Vários estudos realizados no exterior, envolvendo biocombustíveis, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, apontam para balanços energéticos negativos. Pimentel & Patzek (2005) calcularam que são necessárias, aproximadamente, 6597 kcal de energia fóssil para produzir um litro de etanol de milho, nos Estados Unidos. Entretanto, um litro de etanol tem o valor energético de 5130 kcal, resultando em um balanço energético negativo de

1467 kcal, portanto um balanço energético negativo de 29%. Não foi considerada, nesse estudo, a energia gasta no transporte para distribuição do etanol que, segundo DOE (2002), é estimada em 331 kcal. L⁻¹. Sheehan et al. (1998) relataram um saldo negativo na conversão de soja em biodiesel, pois a obtenção de 1MJ de biodiesel exige 1,24 MJ de energia fóssil.

A energia consumida no sistema de produção de uma cultura não é de fácil determinação, pois depende de muitos fatores. É necessário estimar a energia consumida em todo o processo produtivo, desde a fabricação de máquinas e implementos, a produção de insumos, a semeadura, o manejo e a colheita, até o transporte do produto agrícola ao local de processamento.

O consumo de combustível nas operações agrícolas pode apresentar variação em uma mesma operação, pois depende dos fatores clima, topografia, tipo de solo, profundidade de trabalho, tamanho e forma da área de trabalho, habilidade do operador e outros. No Brasil, que é um país de dimensões continentais, é difícil considerar valores exatos de gastos, por isso tomam-se como base valores médios.

O objetivo deste trabalho foi efetuar um levantamento dos gastos de energia nos sistemas de produção de girassol e soja para fabricação de biodiesel.

Materiais e Métodos

As operações do sistema de produção da matéria prima, que redundam em gastos energéticos, são descritas na Tabela 1.

Para o cálculo da energia necessária na fabricação das máquinas e dos implementos, dos fertilizantes e dos agrotóxicos, bem como o valor energético do óleo diesel, e a energia contida na semente de girassol e na de soja, adotaram-se os valores de Pimentel & Patzek (2005), que fornecem a energia necessária para a produção de cada unidade do insumo empregado na produção.

Adotou-se o sistema de semeadura direta e os cálculos consideraram os gastos de energia na pré-semeadura, na semeadura, no manejo, na colheita e no transporte da produção e na fase industrial.

Tabela 1. Atividades que requerem gasto de energia no cultivo de girassol e soja no Brasil.

Pré-Semeadura	Semeadura	Manejo	Colheita	Transporte
Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra
Trator	Trator	Trator	Colhedora	Caminhão
Pulverizador	Sementes	Nitrogênio (cobertura) ¹	Trator ²	—
Dessecante	Plantadora / adubadora		Pulverizador ²	—
Micronutriente (Boro) ¹	Adubação	Pulverizador	Dessecante ²	—
	Nitrogênio (semeadura) ¹	Inseticida	—	—
Calagem	Fósforo	Herbicida	—	—
Trat. sementes	Potássio	—	—	—
Inoculação ²	—	Micronutriente Co e Mo ²	—	—
Combustível	Combustível	Combustível	Combustível	Combustível
—	—	Fungicida	—	—

¹ Não utilizado na cultura de soja² Não utilizado na cultura de girassol

Assumiu-se, de acordo com Pimentel & Patzek (2005), que uma pessoa trabalha 2.000 horas ano⁻¹ e seu gasto energético equivale ao uso de 8.000 litros de óleo ano⁻¹. O cálculo da depreciação de máquinas e equipamentos foi baseado em dados de Pimentel & Pimentel (1996).

Knowles & Bukantis (1980) calcularam o gasto de 8,6 horas de mão-de-obra ha⁻¹, para a cultura de girassol e 7,1 horas ha⁻¹ para a cultura de soja, considerando todas as etapas de produção. No sistema de semeadura direta da soja, que demanda 6,3 horas de mão-de-obra ha⁻¹, a redução de 0,8 horas ha⁻¹, que equivale a 11% do total, é referente a uma menor demanda de mão-de-obra no manejo do solo.

Nas condições dos EUA, Knowles & Bukantis (1980) estimaram um gasto de 180 e 38,8 litros de óleo diesel ha⁻¹, para as culturas de girassol e soja,

respectivamente. No Brasil, estudos de Roessing et al. (1981) estimaram um gasto de 54 litros de óleo diesel ha^{-1} , no sistema de semeadura direta, e demonstraram que esse sistema economizou cerca de 70% de óleo diesel em relação ao sistema convencional. Para a soja, adotou-se o valor de 66 litrosⁱ, referentes ao trator New Holland 135 TM, 93 kW Transmissão de 24 x 12 velocidades e tração auxiliar.

Castro & Oliveira (2005) recomendam a adubação de girassol, utilizando doses entre 40 a 60 kg ha^{-1} de nitrogênio e, em solos com médio teor de fósforo e potássio, deve-se utilizar 18 kg ha^{-1} e 33 kg ha^{-1} , respectivamente, estimando uma produtividade de 2000 kg ha^{-1} . Para a cultura de soja, conforme Embrapa (2005), adotou-se a proporção 0-20-20 (NPK), para uma produtividade de 3000 kg ha^{-1} .

Blamey et al. 1997, citados por Pimentel & Patzek (2005), estimaram o uso de 1 t ha^{-1} de calcário na cultura de girassol. Para a soja, adotou-se 2 t ha^{-1} .

Adubações de boro com 1 kg ha^{-1} em solos arenosos e de 3 kg ha^{-1} em solos argilosos, têm sido consideradas como adequadas para eliminar as deficiências desse micro-elemento em cultivares sensíveis (Blamey et al. 1979, citados por Castro & Oliveira 2005).

Silveira et al. (2005) estimaram variação de 3,0 kg ha^{-1} a 4,5 kg ha^{-1} na quantidade de semente de girassol. O cálculo de sementes para soja foi baseado na fórmula $Q=(1000 \times P \times D) \times 1,1 \text{ (GxE)}^{-1}$ onde $P= 10,4\text{g}$ (peso de 100 sementes), $D= 14$ (número de plantas por metro), $G= 80\%$ (% de emergência em campo) e, $E= 0,4 \text{ m}$ (espaçamento utilizado).

Blamey et al. 1997, citados por Pimentel & Patzek (2005), consideraram um gasto de 3,0 kg ha^{-1} de herbicida, valor confirmado por Brighentiⁱⁱ. O gasto com inseticida foi estimado em 1,0 kg ha^{-1} , de acordo com Corsoⁱⁱⁱ. Conforme planilha de custos (2004/05) fornecida por A. C. Roessingⁱ, tem-se para herbicida: POS 1, Classic; 0,07 litros (soja), POS 2, Select 240 0,40 litros e para inseticida: Dimilin 0,03 litros, Baculovirus 1 dose (soja), Endossulfan 350 CE 1 litro.

ⁱ Informação pessoal A.C. Roessing, Pesquisador Embrapa Soja, 2006.

ⁱⁱ Informação pessoal A. Brighenti, Pesquisador Embrapa Soja, 2006.

ⁱⁱⁱ Informação pessoal I. C. Corso, Pesquisador Embrapa Soja, 2006.

Foi considerado um valor médio de 270 km e 154 km, para o transporte do maquinário, do combustível, da semente e do escoamento da produção de girassol e soja, respectivamente.

Os gastos, no processamento industrial, foram estimados segundo Pimentel & Patzek (2005), sendo calculados os gastos com a energia para transformação do grão em óleo e a posterior transformação do óleo em biodiesel.

Resultados e Discussão

Na cultura do Girassol, em média, para cada tonelada de grão são produzidos 400 kg de óleo, 250 kg de casca e 350 kg de torta, (Oliveira & Vieira 2004). Fonseca^{IV} considera que 1,0 kg de óleo de girassol ou de soja contem 9.000 kcal de energia.

De acordo com esses valores, necessitam-se 2,5 kg de grãos de girassol para produzir 1 kg de óleo. Para uma produtividade média de 2 t ha⁻¹ de grãos obtêm-se 800 kg de óleo ha⁻¹, com valor energético de 7.200.000 kcal ha⁻¹.

A Tabela 2 estima em 2.855.000 kcal a energia (fóssil ou renovável) gasta para produzir 2000 kg ha⁻¹ de girassol.

Na cultura de soja, em média, para cada tonelada de grãos, são produzidos 180 kg de óleo e 820 kg de torta, sendo a quantidade de casca desprezível. Portanto para uma produção de 3000 kg ha⁻¹, obtêm-se uma produção de 540 kg de óleo ha⁻¹, com valor energético de 4.860.000 kcal ha⁻¹.

Os resultados estimados de entradas na indústria de produção de biodiesel são demonstrados na Tabela 3.

O total estimado de energia fóssil gasta para produzir 800 kg de biodiesel de girassol e 540 kg de biodiesel de soja, foram de 1.610.000 kcal e 1.670.000 kcal, respectivamente.

Na Tabela 4, para o girassol, consideraram-se a produtividade de 2000 kg ha⁻¹ e as proporções 40% óleo, 35% de torta e 25% casca que, multipli-

^{IV}Informação pessoal N.A.N. Fonseca, Professora Associada, Dept. de Zootecnia, Universidade Estadual de Londrina, 2005.

Tabela 2. Entradas e Saídas de energia na produção de girassol e soja por hectare no Brasil.

Fator	Girassol		Soja	
	Quantidades	kcal x 1000	Quantidades	kcal x 1000
Mão-de-obra	8,6 horas	344	6,3 horas	252
Maquinário	20 kg	360	20 kg	360
Combustível	54 litros	540	66 litros	660
Nitrogênio	40 kg	640	—	—
Fósforo	18 kg	72	20 kg	83
Potássio	33 kg	107	20 kg	63
Calcário	1000 kg	281	2000 kg	562
Boro	3 kg	11	1 kg	4
Sementes	4 kg	32	50 kg	400
Herbicidas	3 litros	300	0,47 litros	47
Inseticidas	1 litro	100	2,03 litros	203
Transporte	270 km	68	174 km	44
Grãos	2000 kg	—	4000 kg	—
Total de entradas	—	2855	—	2678
Saída	—	7200	—	6480

Tabela 3. Entradas de energia para produção industrial de 800 kg e 540 kg de biodiesel de girassol e soja, respectivamente.

Entradas	Girassol		Soja	
	Quantidades	kcal x 1000	Quantidade	kcal x 1000
Eletricidade	137.75 kWh	137	145.8 kWh	145
Vapor	688.775 kcal	688	729.000 kcal	729
Água de limpeza	81.633 kcal	81	86.400 kcal	86
Calor no espaço interno	77.550 kcal	77	82.080 kcal	82
Calor direto	224.490 kcal	224	237.600 kcal	237
Perdas	133.061 kcal	133	162.000 kcal	162
Aço Inoxidável	6 kg	86	5,4 kg	77
Aço	11 kg	129	10 kg	117
Cimento	29 kg	55	30 kg	57
Total	—	1.610	—	1.670

Tabela 4. Saídas de energia do sistema de produção

Fatores	Girassol		Soja	
	Quantidade	kcal x 1000	Quantidade	kcal x 1000
Casca	Incluído na torta	Incluído na torta	desprezível	desprezível
Óleo	800 kg	7.200	540 kg	4.860
Torta	1.200 kg	4.800	2.460 kg	9.840
Total	2.000 kg	12.000	3.000 kg	14.700
Entradas	Agrícola	2.855	Agrícola	2.678
	Industrial	1.610	Industrial	1.670
Total	–	4.465	–	4.348
Balanco óleo	800 kg	2735 (1: 1,61)	540 kg	512 (1: 1,12)
Balanco geral	–	7.535 (1: 2,69)	–	10.352 (1: 3,38)

cando pelo poder calorífico de cada fração, resultam em 9000 kcal, 4000 kcal e 4000 kcal, respectivamente. Para a soja, adotou-se a produtividade de 3000 kg ha⁻¹, 18% de óleo e 82% de torta.

Considerações Finais

Verifica-se um balanço energético final positivo de 7.535.000 kcal ha⁻¹ em girassol e 10.352.000 kcal ha⁻¹ para soja. Isto significa que, na cultura do girassol, para cada unidade de energia que entra no sistema, são produzidas 2,69 unidades de energia, sendo essa relação de 3,38:1 para a soja. Considerando a utilização da torta, a soja demonstra melhor desempenho energético, por apresentar maior produtividade; porém, analisando apenas a obtenção de óleo, o girassol mostra-se mais eficaz (2735.000 kcal ha⁻¹ x 512.000 kcal ha⁻¹ da soja), por possuir maior teor de óleo no grão.

Referências

CASTRO, C. de; OLIVEIRA, F. A. de. Nutrição e adubação do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. de C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. de. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 317-373.

DOE. **Review of transport issues and comparison of infrastructure**

costs for a renewable fuels standard. Washington, DC: Department Energy. Disponível em: <<http://tonto.eia.doe.gov/FTP/ROOT/service/question3.pdf>>. Acesso em 18 mai. 2006.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil** 2006. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 220 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 9).

KNOWLES, P. F.; BUKANTIS, R. Energy inputs and outputs for crop systems, field crops. In: PIMENTEL, D. (Ed.). **Handbook of energy utilization in agriculture.** Boca Raton: CRC Press, 1980. p. 131-132

OLIVEIRA, M. F. de; VIEIRA, O. V. **Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa.** Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27 p. (Embrapa Soja. Documentos, 237).

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. **Natural Resources Research**, v. 14, n. 1, 2005.

PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. **Food, energy and society.** Boulder: Colorado University Press, 1996. 363 p.

ROESSING, A. C.; MESQUITA, C. M.; GAZZIERO, D. L. P. Consumo de energia na produção de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA, 2., 1981, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro : COPPE/UFRJ, 1981. v. B p. 561-572.

SHEEHAN, J.; CAMOBRESCO, V.; DUFFIELD, J.; GRABOSKI, M.; SHAPOURI, H. **Overview of biodiesel and petroleum diesel lyfe cycles.** [S.l.]: U.S. Department of Energy. National Renewable Energy Laboratory, 1998.

SILVEIRA, J. M.; CASTRO, C. de; MESQUITA, C. de M.; PORTUGAL, F. A. F. Semeadura e manejo da cultura de girassol. In: LEITE, R. M. V. B. de C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. de. (Ed.). **Girassol no Brasil.** Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 381

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M. Produção de biocombustíveis, a questão do balanço energético. **Revista de Política Agrícola**, v. 14, n. 5, p. 42-46, 2005.

Balanço energético na cultura da mamona para a produção de biocombustível

Rafael Machado e Silva Coronato¹; Paulo Henrique Nardon Felici²; Décio Luiz Gazzoni³; Ricardo Ralisch⁴. ¹Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial - CNPQ; ²Bolsista de Mestrado UEL / Embrapa Soja; ³Pesquisador, Embrapa Soja; ⁴Professor, Agronomia UEL.

Introdução

Existem diversas culturas oleaginosas, potenciais fornecedoras de óleos vegetais para a produção de biodiesel. Precisamos avaliar qual dessas culturas é mais viável para esse fim. Um dos métodos para realizar tal avaliação é através do balanço energético, que compreende a relação entre a energia investida na produção do combustível e a energia obtida na sua combustão. O balanço energético indica a viabilidade econômica e ambiental para cada cultura, (Almeida Neto et al., 2006).

A energia consumida no sistema de produção de uma cultura não é de fácil determinação, pois depende de muitos fatores. É necessário estimar a energia consumida na produção e na operação de tratores e equipamentos, na produção e na aplicação de agrotóxicos e fertilizantes, no transporte de implementos e insumos, a energia contida no combustível, bem como a despendida pelo operador, (Roessing et al., 1980).

A mamoneira, provavelmente originada da Ásia, possui, em média, 49% de óleo no grão, é resistente à seca e possui alta adaptabilidade para fotoperíodo e clima, sendo uma alternativa para gerar emprego e renda, principalmente no Norte e Nordeste do Brasil.

Objetivo

Realizar o balanço energético na cultura da mamona, comparando o sistema de cultivo manual e o sistema de cultivo mecanizado, considerando os processos de produção agrícola e industrial do biodiesel.

Materiais e Métodos

As atividades que exigem gasto energético na produção agrícola e no transporte para a cultura de mamona, estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Atividades que requerem gasto de energia no cultivo de mamona no Brasil.

Pré-semeadura	Semeadura	Manejo	Colheita	Transporte
Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra
Trator ²	Trator ²	Trator ²	Colhedora ²	Caminhão
Pulverizador ²	Sementes	Desbaste ¹	Combustível ²	Combustível
Fungicida	Adubo N-P-K	Capina ¹	—	—
Combustível ²	Combustível ²	Herbicida	—	—
—	—	Inseticida	—	—
—	—	Adubo N	—	—
—	—	Combustível ²	—	—

¹ Não utilizado no cultivo de mamona mecanizada

² Não utilizado no cultivo de mamona manual

Para o cálculo da energia gasta com a produção de fertilizantes e agrotóxicos, assim como o valor energético do diesel consumido, utilizou-se os estudos de Pimentel & Patzek (2005), que fornecem a energia consumida em kcal por unidade de produto. O cálculo da energia contida na semente foi baseado nos estudos de Almeida Neto et al. (2006).

Segundo Pimentel & Patzek (2005), uma pessoa trabalha em média 2.000 horas por ano e seu gasto energético equivale a 8.000 litros de óleo diesel. Com base nesses estudos, estimou-se o gasto energético com mão-de-obra.

A quantidade de homens necessária na semeadura é de 40 homens.ha⁻¹, no cultivo manual, e três homens.ha⁻¹, no cultivo mecanizado¹, em uma jornada de 8 horas, considerando ainda que, 8000 litros de óleo diesel equivalem a 20.000.000 kcal Pimentel & Patzek (2005), são gastos 3.200.000 e 240.000 kcal por dia, respectivamente para cultivo manual e mecanizado.

¹ Severino S.L., Pesquisador, Embrapa Algodão. Informação Pessoal, 2006

O cálculo da depreciação de máquinas e equipamentos baseou-se em estudos de Pimentel e Pimentel (1996).

Para o cultivo manual não há gasto com combustível, porém, no cultivo mecanizado são necessários 120 litros.ha⁻¹, que equivalem a 1.200.000 kcal, segundo estimativas médias de um consumo de 12 litros.hora⁻¹, em uma máquina agrícola^{II}.

A adubação em mamona varia conforme o sistema de cultivo. Para o cultivo manual, as proporções são 50 kg de N (1/3 na semeadura e 2/3 em emergência), 60 kg de P e 40 kg de K, ambos na semeadura^{III}, para uma produtividade de 1200 kg ha⁻¹, o que demanda uma energia de 1.169.000 kcal Pimentel & Patzek (2005). No cultivo mecanizado utiliza-se: 80 kg de N, fornecidos parceladamente de modo similar ao manual, 60 kg de P e 40 de K^{IV}, para uma produtividade de 1800 kg.ha⁻¹ que demanda 1.649.000 kcal Pimentel & Patzek (2005). Segundo estudos de Almeida et al. (2006) os gastos para estas quantidades de adubo seriam 1.122.000 e 1.550.000 kcal respectivamente para cultivo manual e mecanizado. Estas variações devem-se, provavelmente, às diferentes formas de produção do adubo. Desconsideraram-se estas diferenças neste trabalho.

A quantidade de semente varia conforme o sistema de cultivo. Para o cultivo manual, a quantidade de sementes foi de 17,5 kg.ha⁻¹ (peso 100 sementes = 70 gramas) e para o mecanizado, 7,5 kg.ha⁻¹ (peso 100 sementes = 30 gramas). O cálculo considera germinação de 80% e população de 20.000 plantas.ha⁻¹.

O uso de herbicida ocorre apenas no cultivo mecânico. Considerou-se o uso de diuron 1,6 kg ia = 3,2 L.ha⁻¹. A quantidade de inseticida para cultivo manual é 1,9 kg.ha⁻¹, sendo 0,2 kg de endosulfan e 1,7 de carbosulfan, utilizado no tratamento de semente. Para o cultivo mecanizado, utiliza-se maior quantidade de inseticida (6 kg.ha⁻¹).

^{II} *Abi-Saab, O. J. G. Docente do departamento de agronomia, Universidade Estadual de Londrina. Informação Pessoal, 2006*

^{III} *Severino S. L. Pesquisador, Embrapa Algodão. Informação Pessoal, 2006*

^{IV} *Severino S. L. Pesquisador, Embrapa Algodão. Informação Pessoal, 2006*

No transporte da maquinaria, do combustível, da semente e do escoamento da produção, estimou-se uma distância média de 250 km (Pimentel & Patzek, 2005). O veículo considerado foi caminhão movido a diesel.

O balanço final energético foi calculado subtraindo a energia gasta nas produções agrícola e industrial, da energia obtida com a produção dos grãos, óleo e subprodutos.

O cálculo dos gastos industriais foi calculado com base nos estudos de Pimentel e Patzek (2005), e esse processo corresponde à extração do óleo do grão e sua posterior transformação em biodiesel.

Resultados e Discussão

Em média, para cada tonelada de grãos de mamona produzida são obtidos 490 kg de óleo e 510 kg de torta (Azevedo, 2001).

São necessários 2,04 kg de mamona para a produção de 1 kg de óleo. Considerando-se que 1 kg de óleo de mamona contém 9.000 kcal, têm-se 588 e 882 kg de óleo.ha⁻¹, o que correspondem a 5.292.000 e 7.938.000 kcal, para os sistemas manual e mecanizado, respectivamente.

De acordo com a Tabela 2, a estimativa de energia fóssil gasta para produzir 1200 e 1800 kg.ha⁻¹ de mamona, foi 5.149.000 e 4.615.00 kcal para os sistemas manual e mecanizado, respectivamente.

A quantidade de energia fóssil gasta para produzir 588 e 882 kg de biodiesel de mamona no sistema manual e mecanizado, é 1.182.000 e 1.772.000 kcal, respectivamente.

No cálculo da Tabela 4, considerou-se a produtividade de 1200 e 1800 kg.ha⁻¹ de mamona, para os sistemas manual e mecanizado, respectivamente. As proporções são de 49% de óleo, 51 % de torta e poder calorífico de 9.000 kcal.l⁻¹ para óleo e 4.000 kcal.kg⁻¹ para torta.

Tabela 2. Entradas e saídas de energia por hectare, na produção de mamona no Brasil, comparando os sistemas manual e mecanizado.

Fator	Manual		Mecânica	
	Quantidade	kcal x 1000	Quantidade	kcal x 1000
Mão de obra	40 homens.dia ⁻¹	3200	3 homens.dia ⁻¹	240
Maquinário	20 kg	360	20 kg	360
Combustível	–	–	120 l	1.200
Nitrogênio	50 kg	800	80 kg	1.280
Fósforo	60 kg	240	60 kg	240
Potássio	40 kg	129	40 kg	129
Sementes	17,5 kg	24	7,5 kg	11
Herbicida	–	–	3,2 kg	349
Inseticida	1,9 kg	190	6 kg	600
Transporte	250 km	206	250 km	206
Grãos	1.200 kg	–	1.800 kg	–
Total de entrada	–	5.149	–	4.615
Saída (óleo)	–	5.292	–	7.938

¹ Considerou-se, também, a mão-de-obra com desbaste e capina manual.

Tabela 3. Entradas de energia para produção industrial de 588 e 882 kg de biodiesel de mamona no sistema manual e mecanizado, respectivamente.

Entradas	Sistema manual		Sistema mecanizado	
	Quantidade	kcal x 1000	Quantidade	kcal x 1000
Eletricidade	101.952	101	152.928	152
Vapor	506.249	506	759.373	759
Água de limpeza	59.864	59	89.796	89
Calor no espaço interno	56.803	56	85.204	84
Calor direto	164.759	164	247.138	246
Perdas	97.845	98	146.767	147
Aço Inoxidável	4.2	63	6.3	94
Aço	7.8	95	11.7	142
Cimento	21	40	31,5	60
Total	–	1182	–	1772

Tabela 4. Saídas de energia do sistema de produção.

Fatores	Sistema manual		Sistema mecanizado	
	Quantidade	kcal x 1000	Quantidade	kcal x 1000
Casca	Incluído na torta	Incluído na torta	Incluído na torta	Incluído na torta
Óleo	588 kg	5.292	882 kg	7.938
Torta	612 kg	2.448	918 kg	3.672
Total	1200 kg	7.740	1800 kg	11.610
Entradas	Agrícola	5.149	—	4.615
	Industrial	1.182	—	1.772
Total		6.331		6.387
Balanco óleo	588 kg	-1039 (1: 0,83)	882 kg	1551 (1: 1,24)
Balanco final		1409 (1: 1,22)		5223 (1: 1,82)

Considerações Finais

Verifica-se um balanço energético positivo para mamona de 5.233.000 kcal para o cultivo mecanizado e 1.409.000 kcal.ha⁻¹ no sistema manual. Isto indica que no sistema mecanizado, para cada unidade que entra, produz-se 1,82. No sistema manual, produz-se 1,22. Porém, se considerarmos apenas a energia contida no óleo, teremos um balanço negativo para o sistema manual de 1.039.000 kcal ha⁻¹, significando uma retirada de 0,83 unidades de energia do sistema para cada unidade investida.

Referências

- ALMEIDA NETO, J. A. de; CRUZ, R. S. da; ALVES, J. M. ; PIRES, M. de M.; ROBRA, S.; PARENTE JUNIOR, E. Balanço energético de ésteres metílicos e etílicos de óleo de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., Campina Grande. **Energia e sustentabilidade**. Disponível em: <http://www.redebaianadebiocombustiveis.br.gov.br/arquivo/165.pdf> . Acesso em: 17 jul. 2006.
- AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. 350 p.

MORALES UDAETA, M. E.; BAITILO, R. L.; BURANI, G. F.; GRIMONI, J. A. B. Comparação da produção de energia com diesel e biodiesel analisando todos os custos. Grupo de Energia do Departamento de Engenharia de Energia e Automação Elétricas da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.agr.unicamp.br/energia/agre2004/Fscommand/PDF/Agrener/Trabalho%2084.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2006.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. **Natural Resources Research**, v. 14, n. 1, 2005.

PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. **Food, energy and society**. Boulder: Colorado Univ. Press, 1996. 363 p.

ROESSING, A. C.; MESQUITA, C. M.; GAZZIERO, D. L. P. Consumo de energia na produção de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA, 2., 1981, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro : COPPE/UFRJ, 1981. v. B, p. 561-572.

Balanco energético na cultura de canola para a produção de biocombustível

Rafael Machado e Silva Coronato¹; Paulo Henrique Nardon Felici²; Décio Luiz Gazzoni³; Ricardo Ralisch⁴. ¹Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial - CNPQ; ²Bolsista de Mestrado UEL / Embrapa Soja; ³Pesquisador, Embrapa Soja; ⁴Professor, Agronomia UEL.

Introdução

Os combustíveis fósseis poluem o ambiente, causando o efeito estufa. O petróleo é finito e mal distribuído no planeta (UBA, 1999), citado por Almeida Neto et al. (2006).

Diversas são as culturas produtoras de óleo para a produção de biodiesel. Algumas são mais eficientes que outras. Um método de se avaliar as culturas mais eficientes é através do balanço energético, que compreende a relação entre a energia investida na produção do biocombustível (input) e a energia obtida na sua combustão (output). O balanço energético indica as viabilidades econômica e ambiental para cada cultura de acordo com Almeida Neto et al. (2006).

A canola no Brasil, esta sujeita a restrições climáticas e apresenta problemas de colheita. Ainda assim, pelo seu alto teor de óleo (40% a 46%), é considerada uma importante fonte para a produção de biodiesel.

O cultivo da canola acontece na primavera, sendo uma alternativa de renda e diversificação agrícola no período de inverno para as regiões que cultivam trigo no sul do País.

Objetivo

Realizar o balanço energético na cultura da canola, considerando os processos de produção agrícola e industrial do biodiesel.

Materiais e Métodos

As atividades que exigem gasto energético (input) na produção agrícola e no transporte para a cultura de canola, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades que requerem gasto de energia no cultivo de canola no Brasil.

Pré-semeadura	Semeadura	Manejo	Colheita	Transporte
Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra	Mão-de-obra
Trator	Trator	Trator	Colhedora	Caminhão
Pulverizador	Adubação	Adubação	Combustível	Combustível
Dessecante	Sementes	Inseticida	—	—
Herbicida	Combustível	Pulverizador	—	—
Combustível	—	Micronutriente	—	—
—	—	Combustível	—	—

Para o cálculo da energia gasta com a produção de fertilizantes e agrotóxicos, o valor energético do diesel consumido e a energia da semente, utilizaram-se os estudos de Pimentel & Patzek (2005), que fornecem a energia necessária para a produção de cada unidade do insumo empregado na produção.

Segundo Pimentel & Patzek (2005), uma pessoa trabalha em média 2.000 horas por ano e seu gasto energético equivale a 8.000 litros de óleo diesel. Com base nesse dado estimou-se o gasto energético com mão-de-obra.

Em canola, tem-se um gasto de 0,56 horas.ha⁻¹ de mão-de-obra, segundo Tamm (1999), o que equivale a um gasto de 20.000 kcal.

O cálculo de depreciação de máquinas e equipamentos teve como base estudos de Pimentel e Pimentel (1996).

Para combustível, em canola, são necessários 64 litros.ha⁻¹ que equivalem a uma entrada de energia de 640.000 kcal (Chastain, 2006).

A adubação considerada foi de 60 kg N, dividido em 20 kg na semeadura e 40 kg em cobertura (Embrapa 1995) e 60 kg de P e 30 kg de K, segundo Tamm (2003). A produtividade esperada para essas condições é de 2200

kg.ha⁻¹. O consumo energético para esses insumos foi estimado com base nos estudos de Pimentel & Patzek (2005), segundo o qual, o gasto total com os fertilizantes é de 1.297.000 kcal.ha⁻¹, enquanto Chastain (2006) estimou um gasto médio de 1.303.000 kcal.ha⁻¹. Segundo Almeida Neto et al. (2006), o gasto com fertilizantes foi de 1.248.000 kcal.ha⁻¹. Essas variações devem-se, provavelmente, às diferentes formas de produção do adubo, mas, por não representarem grandes variações, considerou-se o valor médio.

A canola foi semeada utilizando 4 kg de sementes por hectare e densidade de 40 plantas por metro quadrado (Tomm, 2003)

O principal herbicida utilizado foi o glyphosate, na quantidade de 2 litros do produto comercial ha⁻¹. Quanto ao inseticida, considerou-se o Carbaril, 2,7 litros. ha⁻¹, no combate a vaquinha (Tomm, 2003).

No transporte da maquinaria, do combustível, da semente e do escoamento da produção, considerou-se uma distância de 270 km (Pimentel & Patzek, 2005).

Os gastos com processamento industrial foram estimados segundo Pimentel & Patzek (2005), com base na energia consumida para transformar o grão em óleo e posterior transformação do óleo em biodiesel.

Resultados e Discussão

Em média, para cada tonelada de grãos produzidos, são obtidos 400 kg de óleo e 600 kg de torta (Tomm, 2003). Considerando que 1 kg de óleo de canola contém 9.000 kcal.

De acordo com esses valores, são necessários 2,5 kg de grãos de canola para se produzir 1 kg de óleo de canola. Sua produtividade média de 2200 kg.ha⁻¹ de grãos, oferecem 880 kg de óleo.ha⁻¹, com valor energético de 7.920.000 kcal.ha⁻¹.

De acordo com a Tabela 2, a estimativa da energia fóssil gasta para produzir 2200 kg.ha⁻¹ de canola foi de 2.851.000 kcal.

A quantidade de energia fóssil gasta para produzir 880 kg de biodiesel de canola é 1.771.000 kcal.

Tabela 2. Entradas e saídas de energia na produção de canola por hectare no Brasil.

Fator	Quantidade	kcal x 1000
Mão-de-obra	0,56 h	20
Maquinário	8,4 kg	152
Combustível	64 l	640
Nitrogênio	60 kg	960
Fósforo	60 kg	240
Potássio	30 kg	97
Sementes	4 kg	32
Herbicida	2 kg	218
Inseticida	2,7 kg	270
Transporte	270 km	222
Grãos	2200 kg	–
Total de entrada	–	2.851
Saída (óleo)	–	7.920

Tabela 3. Entradas de energia para produção industrial de 880 kg de biodiesel de canola.

Entradas	Quantidade	kcal x 1000
Eletricidade	151.83	151
Vapor	757.85	757
Água de limpeza	89.695	89
Calor no espaço interno	85.607	85
Calor direto	246.538	246
Perdas	146.067	146
Aço Inoxidável	6.6	95
Aço	12	142
Cimento	32	60
Total	–	1771

No cálculo da Tabela 4, considerou-se a produtividade de 2200 kg.ha⁻¹, obtendo-se 40% de óleo, 60 % de torta e poder calorífico de 9.000 kcal L⁻¹ para o óleo e 4.000 kcal.kg⁻¹ para a torta.

Tabela 4. Saídas de energia do sistema de produção.

Balanço energético final		
Fatores	Quantidade	kcal x 1000
Casca	Desprezível	Desprezível
Óleo	880 kg	7.920
Torta	1320 kg	5.280
Total	2200 kg	13.200
Entradas	Agrícola	2.851
	Industrial	1.771
Total		4.622
Balanço óleo	880 kg	3298 (1: 1,7)
Balanço final		8578 (1: 2,84)

Considerações Finais

Verifica-se um balanço energético positivo para canola de 8.578.000 kcal. ha⁻¹. Isto indica que, para cada unidade de energia que entra no sistema são produzidas 2,84 unidades de energia.

Referências

- ALMEIDA NETO, J. A. de; CRUZ, R. S. da; ALVES, J. M. ; PIRES, M. de M.; ROBRA < S.; PARENTE JUNIOR, E. Balanço energético de ésteres metílicos e etílicos de óleo de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., Campina Grande. **Energia e sustentabilidade**. Disponível em: <<http://www.redebaianadebiocombustiveis.br.gov.br/arquivo/165.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2006.
- CHASTAIN, T. **Canola: a biodiesel crop for Oregon**: OSU, Oregon State University, Department of crop and soil science, Canadá. Disponível em: <<http://www.biofuels4oregon.com/presentations/tom%20chastian.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2006.
- PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass,

and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. **Natural Resources Research**, v. 14,n. 1, 2005.

PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. **Food, energy and society**. Boulder: Colorado University Press, 1996. 363 p.

RECOMENDAÇÕES técnicas para o cultivo de canola no Estado do Paraná em 1995. In: RECOMENDAÇÕES técnicas para a cultura do trigo no Estado do Paraná. Cascavel, 1995. p. 106-114 (OCEPAR. Boletim Técnico, 37).

TOMM, G. O. **Canola: aspectos fundamentais para o sucesso da cultura**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 4 p.

TOMM, G. O. **Tecnologia para cultivo de canola no Sudoeste de Goiás**. [S.l.]: Caramuru, 2003. 34 p.

Efeito da localização de armadilhas na captura de percevejos da soja, em sistema de semeadura direta e convencional

Mariana Campona Nonino¹; Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira²; Rosimeire Choucino³. ¹Bolsista Mestranda UEL / Embrapa Soja; ²Pesquisador Embrapa Soja; ³Laboratorista Embrapa Soja.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é hoje umas das principais culturas do Brasil, segundo maior produtor mundial, onde as vendas de seu complexo agroindustrial representam cerca de 24% das exportações do agronegócio brasileiro (Conab, 2006).

Dentre as pragas de importância econômica, destacam-se os percevejos pentatomídeos. Estes, por se alimentarem diretamente das vagens, atingindo os grãos de soja, afetam diretamente a produção, a qualidade das sementes e ainda transmitem doenças (Belorte et al., 2003). Atualmente, as espécies mais abundantes na cultura são o percevejo marrom (*Euschistus heros* (Fabr.)), o percevejo verde (*Nezara viridula* (L.)) e o percevejo verde-pequeno (*Piezodorus guildinii* (West.)) (Cividanes & Parra, 1994).

Em sistemas convencionais, práticas como a aração e a gradagem minimizam o problema causado por algumas pragas, que passam, pelo menos, uma fase de seu ciclo no solo ou na superfície deste (Bianco, 1984). Com a adoção do sistema de semeadura direta, e conseqüentemente, a não-movimentação do solo, muitos insetos-pragas, incluindo algumas espécies de percevejos, tiveram seu desenvolvimento e sobrevivência favorecidos. Entretanto, o sistema também favoreceu o desenvolvimento e a persistência de fungos, bactérias e vírus, agentes controladores dessas pragas.

Na agricultura orgânica, o controle dos insetos-pragas deve ser efetuado com medidas alternativas que preservem o equilíbrio do agroecossistema. Dentre essas alternativas, destaca-se o uso de armadilhas, visando reduzir a população dos insetos. Essas armadilhas são usadas com sucesso para

algumas pragas como *Diabrotica speciosa* (Ger.), em feijoeiro (Ventura et al., 2005), moscas-das-frutas, em citrus (Paiva, 2004). Na soja, resultados obtidos por Corrêa-Ferreira et al. (2003) mostraram o elevado número de captura e o potencial de uso no manejo dos percevejos sugadores de grãos.

Com o objetivo de estudar o efeito de localização das armadilhas, na quantidade de percevejos capturados, comparou-se armadilhas instaladas na borda e no meio da lavoura, em dois sistemas de semeadura, direto e convencional.

O trabalho foi realizado na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, em Londrina - PR, safra 2005/06. Em áreas adjacentes, com soja em semeadura direta e convencional, foram instaladas armadilhas Pet com água + sal (27g/l) (Corrêa - Ferreira & Choucino, 2002), na borda e no meio das áreas. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (borda e meio) e 10 repetições, para cada sistema. Semanalmente, a solução era trocada e os percevejos capturados eram retirados e levados ao Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Soja, onde eram contados e registrados por espécie e sexo.

Foram realizadas oito coletas entre o início do florescimento (R1) e a maturação da soja (R8), onde capturou-se, em semeadura convencional, um total de 2878 percevejos e, em semeadura direta, 1375. As espécies de percevejos mais abundantes, nos dois sistemas foram *E. heros*, *P. guil-dinii* e *Thyanta perditor* (Fabr.), além de outras espécies que ocorreram em menor abundância, como *N. viridula*, *Edessa meditabunda* (Fabr.), *Dichelops melacanthus* (Dallas) e *Chinavia* spp. Também foi capturado, em número significativo, a espécie *Neomegalotomus parvus* (West.) da família Alydidae (Tabela 1).

Constatou-se uma maior captura de percevejos adultos, sendo coletadas apenas quatro ninfas, em todas as avaliações. Resultado semelhante foi descrito por Hoffmann-Campo et al. (2003), que afirmaram que o comportamento desses insetos explica esses resultados. Segundo esses autores, as armadilhas devem ser normalmente instaladas na bordadura da lavoura, desde o período inicial da cultura, com a finalidade de capturar a população colonizante.

Tabela 1. Número total de percevejos capturados nas armadilhas Pet, instaladas na soja, em diferentes sistema de semeadura, na safra 2005/06.

Semeadura	Pentatomidae							Alydidae	
	<i>E. heros</i>	<i>P. guildinii</i>	<i>T. perditor</i>	<i>N. viridula</i>	<i>E. mediatubunda</i>	<i>D. melacanthus</i>	<i>Chinavia</i> spp.	<i>N. parvus</i>	Total
Direta	749	290	228	25	11	5	0	67	1375
Convencional	2222	335	23	45	47	10	7	189	2878

No experimento realizado, nas armadilhas instaladas no meio da área, foi coletado um total de 2079 percevejos e, naquelas instaladas nas bordas, o total foi de 2174, mostrando que para o período reprodutivo da soja (R1 – R8), a coleta também é eficaz no meio da área, podendo as armadilhas serem distribuídas em toda a área e não somente na bordadura.

Na semeadura convencional, a quantidade de percevejos coletada aumentou até o final do desenvolvimento de vagens (R4), quando coletou-se, em média, 51,30 percevejos na borda e 36,70 no meio por armadilha, decaindo a partir daí até a última coleta, quando capturou-se apenas 2,00 no meio e 2,10 percevejos por armadilha, na borda da área. A presença dos percevejos nas duas primeiras coletas (R1 – R2) foi maior nas armadilhas instaladas no meio da área sendo posteriormente coletados em maior número naquelas instaladas nas bordas (Fig. 1).

Na semeadura direta, a quantidade de percevejos capturados aumentou até o enchimento de grãos (R6), quando coletou-se, em média, 14,10 na borda e 22,60 percevejos/armadilha no meio, diminuindo até a maturação (R8), quando o número capturado foi de 1,60 na borda e no meio da área. A abundância dos percevejos nas duas localizações (borda e meio) apresentou um comportamento alternado ao longo do desenvolvimento da soja (Fig. 2).

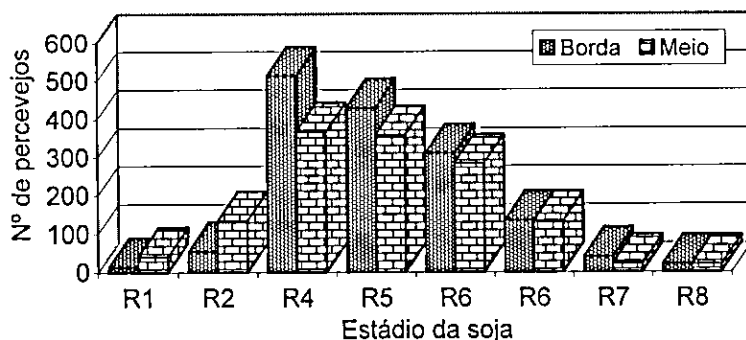


Figura 1. Número total de percevejos capturados nas armadilhas, instaladas no meio e na borda da área de soja, em semeadura convencional, na safra 2005/06.

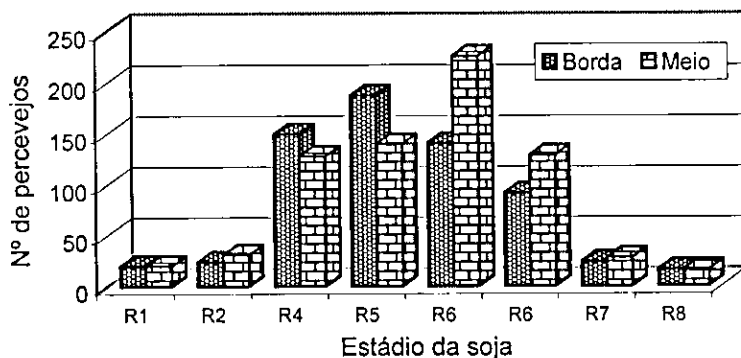


Figura 2. Número total de percevejos capturados nas armadilhas, instaladas no meio e na borda da área de soja, em semeadura direta, na safra 2005/06.

Nessa área, houve uma grande quantidade de plantas daninhas, que se instalaram a partir de R5 e se mantiveram até o final do desenvolvimento da soja. Esse fato pode ter influenciado o comportamento dos percevejos, mascarando a real localização desses na área.

Dos percevejos capturados, as fêmeas sempre foram mais abundantes que os machos, tanto na semeadura direta quanto na convencional. Entretanto, na área convencional as fêmeas foram mais capturadas na borda e os

machos mais abundantes no meio (Fig. 3A), variando de 0,60 a 4,00 vezes mais na borda e 0,75 a 9,33 no meio.

Este comportamento não se repetiu na semeadura direta, onde machos e fêmeas foram mais abundantes em armadilhas instaladas no meio (Fig. 3B), variando de 1,62 a 4,89 nas armadilhas instaladas na borda e 0,37 a 3,56 vezes maior a captura nas armadilhas no meio.

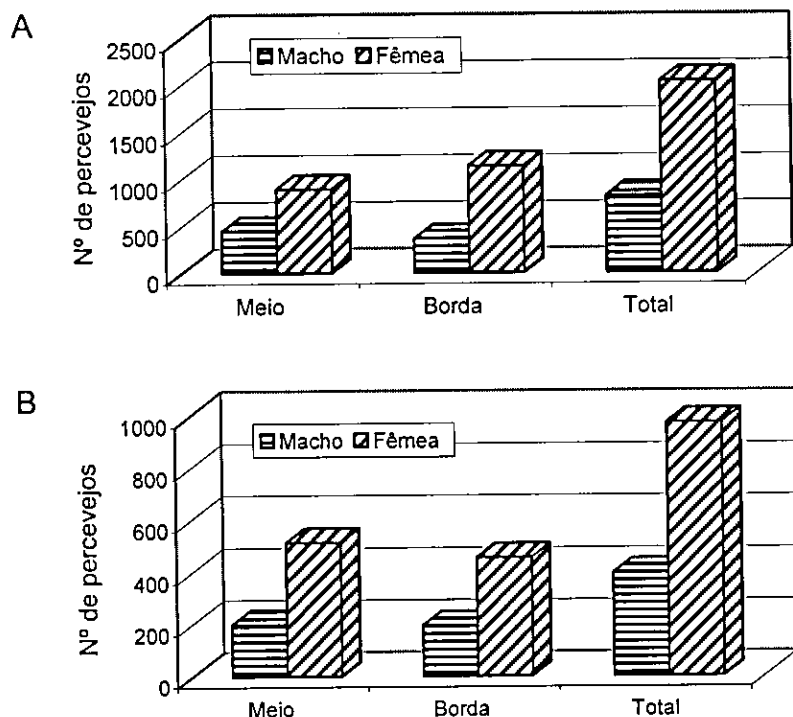


Figura 3. Número total de fêmeas e machos capturados em armadilhas Pet, instaladas no meio e na borda de cultivo de soja convencional (A) e direto (B), na safra 2005/06.

Para o período reprodutivo da soja, os resultados mostraram que, para a captura de percevejos, a disposição das armadilhas pode ser feita de maneira aleatória, instaladas nas bordas e no meio da lavoura, pois a captura dos insetos foi eficiente em ambos os locais. Entretanto, foi observada

diferença na captura dos percevejos entre o tipo de semeadura, sendo coletados, em maior densidade, na convencional do que na direta.

Referências

- BEORTE, L. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M.; MARINO, C. A. B. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba, SP. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, 2003.
- BIANCO, R. Ocorrência de pragas no plantio direto e convencional. In: FANCELLI, A. L.; TORRADO, P. V.; MACHADO, J. (Coord.) **Atualização em plantio direto**. Campinas: Fundação Cargill, 1984. 183-194 p.
- CIVIDANES, F. J.; PARRA, J. R. P. Zoneamento ecológico de *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West) e *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) em quatro estados produtores de soja do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, p. 219-226, 1994.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <www.conab.gov.br> Acesso em 20. jul. 2006.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; CHOUCINO, R. A. S. Uso de armadilhas com urina bovina, na coleta de percevejos da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2. MERCOSOJA, 2002, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 276. (Embrapa Soja. Documentos, 181).
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; NUNES, M. C.; PERES, W. A. A.; CORSO, I. C.; AZEVEDO, J.; CHOUCINO, R. Utilização do controle biológico por parasitoides no Manejo Integrado de Pragas da Soja. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa em soja. **Resultado de Pesquisa da Embrapa Soja – 2002**. Londrina, 2003. p. 31-43.
- HOFMANN-CAMPO, C. B.; SOSA-GOMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; GAZZONI, D. L. Alternativas potenciais para uso no manejo de pragas da soja. In: CORRÊA-FERREIRA, B. S. (Org.) **Soja orgânica: alternativas para o manejo dos insetos-pragas**. Londrina: Embrapa - CNPSo, 2003. p. 65-83.

PAIVA, P. E. B. **Moscas-das-frutas em citros: densidade de armadilhas para monitoramento, efeito do pH na atração e determinação do nível de controle.** 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

VENTURA, M. U; RESTA, C. C. M.; NUNES, D. H.; FUJIMOTO, F. Trap attributes influencing capture of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) on common bean fields. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 351-356, 2005.

Efeito de produtos orgânicos na atividade alimentar de *Euschistus heros* (F.) e *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), em vagens de soja

Mariana Campona Nonino¹; Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira². ¹Bolsista Mestranda UEL / Embrapa Soja; ²Pesquisador Embrapa Soja.

Sistemas orgânicos objetivam criar agrossistemas sustentáveis sob aspectos ecológicos, econômicos e sociais, além de preservar a diversidade das espécies, o manejo conservacionista do solo, o uso mínimo de insumos externos, a eliminação de produtos químicos e priorizar a agricultura familiar e os direitos dos trabalhadores (Peres, 2004).

Dentre os cultivos orgânicos que mais cresceram no Brasil, destaca-se a cultura da soja, onde somente no Estado do Paraná, na safra 2003/04, o número de produtores era 625, os quais cultivaram mais de 4,5 mil hectares, com uma produção de mais de 9 mil toneladas (Seab, 2006).

Um dos grandes desafios encontrados na produção orgânica de soja, é o controle de insetos-pragas, pois a cultura é atacada por dezenas de espécies, com potencial de dano e partes atacadas variando para cada espécie (Garcia, 2000).

Dentre essas espécies, o percevejo marrom (*Euschistus heros* (Fabr.)) e o percevejo verde (*Nezara viridula* (L.)), são de grande importância econômica, pois, ao se alimentarem diretamente das vagens, atingem os grãos, afetando a produção e a qualidade das sementes, além de transmitirem doenças (Belorte et al., 2003).

Segundo Miles (1972), citado por Nunes & Corrêa - Ferreira (2002), os percevejos, ao se alimentarem, injetam saliva contendo enzimas digestivas. O excesso de saliva ao redor dos estiletes solidifica-se e forma uma bainha na superfície da vagem. Segundo Panizzi et al. (1995), citado por Nunes & Corrêa - Ferreira (2002), essas bainhas têm sido usadas para indicar a atividade alimentar desses insetos.

Além do controle biológico, o uso de métodos alternativos vem sendo usado com sucesso há algum tempo. Estudos com aplicação de extratos vegetais como o Nim (*Azadirachta indica*) e o alho (*Allium sativum*) já foram registrados na literatura (Abreu Jr., 1998). Entretanto, o uso de produtos à base de “pós de rocha”, são mais recentemente investigados. Com o objetivo de estudar o efeito de produtos orgânicos na atividade alimentar dos percevejos-pragas, testou-se a nível de laboratório, quando aplicados em vagens de soja.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Soja, em Londrina, PR, através de testes de dupla e múltipla escolha para as espécies de percevejos *E. heros* e *N. viridula*.

Para ambos os testes, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos: Bioalho (120ml/ha), Protesyl (5%), Nim (5%) e Protesyl + Nim (5%), realizados com 10 (dupla escolha) e 15 repetições (múltipla escolha).

Utilizou-se os percevejos, *N. viridula* e *E. heros*, com idade de 10 e 24 dias, respectivamente, que foram coletados ao acaso na criação da Embrapa Soja. Após um período de jejum de 24 horas, foram colocados em placas de Petri de vidro (9cm), sendo ofertadas duas vagens de soja, da cultivar Paraná, em estádio R6, sendo uma tratada (imersão em produto) e uma testemunha (imersão em água) e deixados em alimentação por 48 horas. Os insetos foram mantidos em incubadora, com condições controladas de temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), umidade (65%) e fotoperíodo (14h:10h).

Para os testes de múltipla escolha, foram utilizados percevejos de *N. viridula* e *E. heros*, criados em laboratório, com idade de 20 e 24 dias respectivamente, coletadas ao acaso na criação da Embrapa Soja, e deixados em jejum por 24 horas. Após, foram colocados em placas de Petri de vidro (14cm), sendo ofertadas cinco vagens de soja, cultivar Paraná, em estádio R6, sendo quatro tratadas (imersão nos diferentes produtos) e uma testemunha (imersão em água) por 48 horas. Os insetos foram mantidos em incubadora, sob condições controladas, semelhante ao teste de dupla escolha.

Para ambos os testes, após o período de alimentação, as vagens foram individualizadas e submetidas, por 20 minutos, ao corante fucsina. Depois foram lavadas em água corrente para leitura, em microscópio estereoscópio

(10 a 15x), das bainhas alimentares (flanges) deixadas pelos percevejos, em alimentação, nas paredes dessas vagens. Os resultados médios foram comparados pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para os testes de dupla escolha, com *N. viridula*, não se obteve diferença entre os tratamentos, embora observou-se, em geral, maior número de picadas nas vagens testemunhas, em relação àquelas tratadas, com exceção das vagens com Nim que apresentou uma preferência maior. O menor número de picadas foi encontrado no Protesyl, com valor médio de 14,30 (Fig. 1A).

Mesmo não sendo comparados estatisticamente, os produtos Protesyl e Protesyl + Nim foram os que apresentaram melhor desempenho, provocando uma maior repelência a essa espécie de percevejo (Fig. 1A).

No teste de múltipla escolha para *N. viridula*, também não se obteve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha. Entretanto o produto que apresentou o menor número de bainhas nas vagens foi o Bioalho (5,36), seguido do Protesyl + Nim (6,14). Vagens tratadas com Protesyl não apresentaram repelência, obtendo-se um maior número de bainhas alimentares do que a testemunha (Fig. 1B).

Nos ensaios realizados, *E. heros* apresentou comportamento alimentar diferenciado, em relação aos produtos avaliados. No teste de dupla escolha, as vagens tratadas com Protesyl + Nim apresentaram menor número de bainhas alimentares (11,70) diferindo significativamente da testemunha (18,10). Os demais produtos não diferiram da testemunha; entretanto, todos apresentaram um menor número de bainhas (Fig. 2A).

No teste de múltipla escolha, obteve-se diferença significativa entre os produtos, sendo Protesyl + Nim, Nim e Bioalho os produtos que causaram maior índice de repelência aos adultos de *E. heros*. As vagens tratadas com Protesyl não apresentaram repelência, porque o número de bainhas alimentares estatisticamente igual ao da testemunha (Fig. 2B).

Segundo Garcia (2000), uma das ações do óleo de Nim é inibição da alimentação. Os resultados obtidos, corroboram com o autor uma vez que, para *E. heros*, vagens tratadas com Nim apresentaram baixa quantidade de bainhas alimentares. Quando misturado ao Protesyl, a repelência foi maior para *E. heros*, não apresentando resultados semelhantes para *N.*

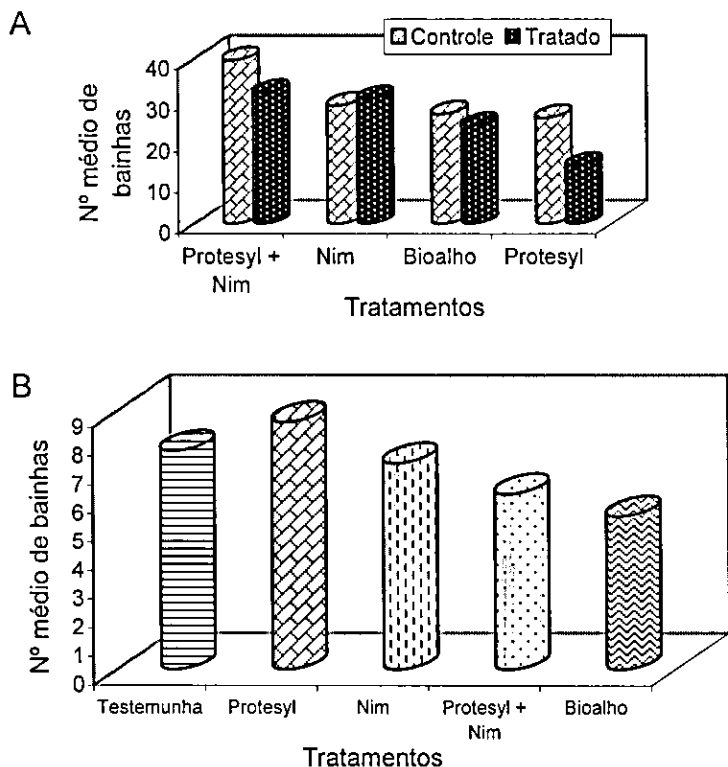


Figura 1: Número médio de bainhas alimentares de *N. viridula*, após 48 horas de alimentação em vagens de soja (R6), tratadas com diferentes produtos, ou não tratadas, em testes de dupla (A) e múltipla escolha (B).

viridula, nos testes de múltipla escolha, mas com bons resultados no teste de dupla escolha. Entretanto, vagens tratadas com Protesyl não causaram efeito de repelência aos adultos de *E. heros* e *N. viridula*. O Bioalho, produto comercial a base de alho, também mostrou-se eficiente na repelência dos percevejos de ambas as espécies.

Dessa forma, observou-se que as duas espécies de percevejos se comportaram de maneira diferente nos experimentos, quanto à sua atividade alimentar. Protesyl + Nim, Nim e Bioalho foram os produtos que apresentaram efeito repelente aos percevejos embora haja necessidade de estudos mais detalhados.

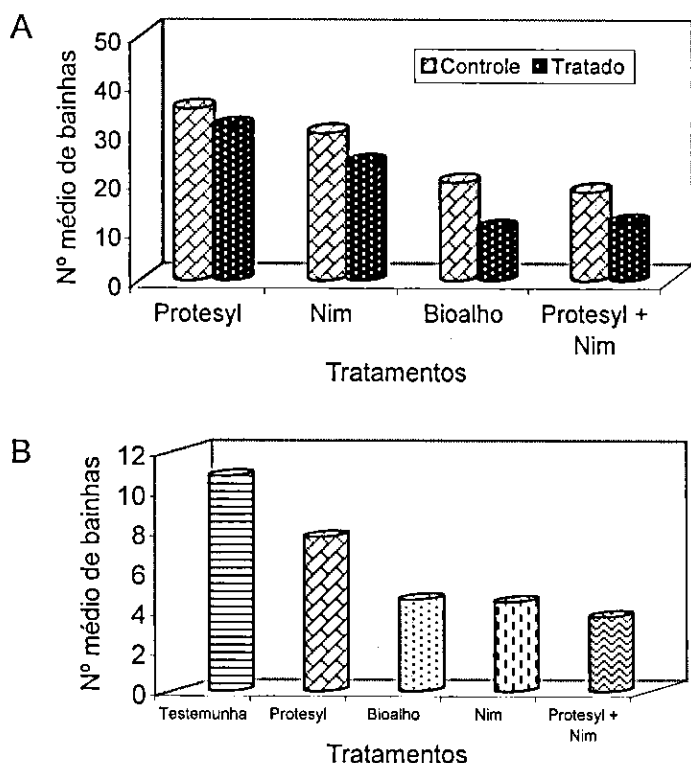


Figura 2. Número médio de bainhas alimentares de *E. heros*, após 48 horas de alimentação em vagens de soja (R6), tratadas com diferentes produtos, ou não tratadas, em testes de dupla (A) e múltipla escolha (B). (Médias nos tratamentos, com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade).

Referências

- ABREU Jr., H. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura: coletânea de receitas.** Campinas: EMOPI, 1998. 112 p.
- BELORTE, L. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M.; MARINO, C. A. B. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba, SP. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, 2003.

GARCIA, J. L. M. **Óleo de Nim - O bioprotetor natural**. Série Agricultura Alternativa. Junho 2000, 13 p.

NUNES, M. C.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Desempenho alimentar e sobrevivência de *Euschistus heros* parasitado por *Hexacladia smithii* em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 9, p. 1219-1223, 2002.

PERES, W. A. de A. **Aspectos bioecológicos e táticas de manejo dos percevejos *N. viridula* (Linnaeus), *Euschistus heros* (Fabricius) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) em cultivo orgânico de soja**. 2004. 160f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SEAB, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Disponível em: <www.pr.gov.br/seab> Acesso em 19. jul. 2006.

Efeito de fungicidas misturados à dieta artificial sobre o consumo e digestão de alimento pela lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner)

Antonio Alberto dos Santos^{1,2}; Lenita Jacob Oliveira²; Daniel Ricardo Sosa-Gomez²; Sérgio Henrique da Silva²; M. C. Salvador^{2,3}. ¹Estudante-Centro Universitário Filadélfia, bolsista Embrapa Soja; ²Embrapa Soja, neto@cnpso.embrapa.br; ³Estudante-FAFICOP.

Introdução

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, é encontrada em todos os locais de cultivo, sendo o desfolhador mais comum da soja no Brasil, ocorrendo desde o sul de Goiás até o Rio Grande do Sul, podendo causar um desfolhamento de até 100%. (Hoffmann-Campo et al., 2000).

O fungo *Nomuraea rileyi* é muito importante para a cultura da soja, visto que ataca a lagarta *A. gemmatalis* em condições de alta umidade e temperaturas amenas. Este patógeno tem propiciado um controle satisfatório concorrendo para diminuir o uso de defensivos na cultura da soja. (Correa & Smith, 1975).

As aplicações de fungicidas na cultura da soja têm se tornado freqüentes a partir do final da década de 90. Apesar do volume crescente, em função da ferrugem asiática, o efeito direto dessas aplicações sobre insetos-pragas e seus inimigos naturais ainda é pouco conhecido. A aplicação de agrotóxicos pode ter efeitos perniciosos sobre fungos entomopatogênicos, interferindo no seu papel de agente de controle natural, ocasionando surtos de pragas. Em muitos sistemas agrícolas, os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle natural de insetos-praga (Sosa-Gómez, 2005). Esse autor concluiu que a maioria dos fungicidas com ação eficaz contra a ferrugem asiática da soja inibiram a germinação de *N. rileyi* e podem prejudicar o controle natural de lagartas.

Sosa-Gómez et al. (2006) observaram que os fungicidas Systhane, Folicur, Impact, Domarck e Opera tiveram algum efeito negativo sobre *A. gemmatilis*.

Objetivo

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de fungicidas utilizados para controle da ferrugem asiática, sobre o consumo alimentar da lagarta-da-soja.

Material e Método

O ensaio foi realizado em laboratório (25°C e 14h de fotofase), com delineamento experimental inteiramente casualizado e 30 repetições. Foram avaliados quatro fungicidas do grupo triazol, tetraconazol (Domark), tebuconazol (Folicur), flutriafol (Impact), miclobutanil (Systhane); um do grupo estrobilurina, azoxistrobina (Priori) e uma mistura dos dois grupos, epoxiconazol+piraclostrobin (Opera). Os fungicidas Domarck e Opera foram utilizados na proporção de 0,0149 µL de p.c./ mL de dieta e os demais na proporção 0,0597 µL de p.c./ mL de dieta). Como testemunha, utilizou-se dieta artificial sem fungicidas. Lagartas neonatas foram colocadas em copos com 10 mL da dieta. No início do 3º instar, as lagartas foram individualizadas e observadas diariamente, sendo as pupas pesadas com 24h de idade.

Os copos utilizados foram pesados antes e, logo após receberem a dieta fresca. No final do ensaio, os copos contendo os restos de dieta foram secos em estufa e novamente pesados. A conversão do peso fresco da dieta inicial para peso seco foi feita através de um fator de correção, calculado a partir de cinco copos controle de cada tratamento, mantidos sem lagartas, pesados antes e após secagem em estufa. O consumo de dieta, durante o período no qual as lagartas ficaram individualizadas, também foi avaliado, através da diferença de peso seco da dieta inicial e final.

As fezes produzidas durante o período foram recolhidas, secas em estufa e pesadas.

Resultados e Discussão

O consumo de dieta misturada aos fungicidas flutriafol (Impact) e miclobutanil (Systhane) foi significativamente menor do que na testemunha (dieta pura). Nota-se, ainda, que para esses fungicidas o peso de alimento digerido pelas lagartas e peso de fezes produzidas também foi menor (Tabela 1). Entretanto, a proporção de alimento digerido (40%)¹ quando a dieta foi misturada ao flutriafol não foi diferente da proporção digerida na testemunha (42%).

A maior média de peso seco de fezes ocorreu no tratamento epoxiconazol+piraclostrobina (Tabela 1). Entretanto, a proporção de dieta digerida nesse tratamento foi de 51% da dieta ingerida.

Em relação ao peso de pupa, apenas os tratamentos tetraconazol (Domarck), miclobutanil (Systhane), e flutriafol (Impact), diferiram significativamente da testemunha, mostrando uma menor média de peso.

O efeito negativo de flutriafol e miclobutanil sobre a lagarta da soja também foi evidenciado por Sosa-Gómez et al. (2006), que observaram uma alta mortalidade de lagartas de *A. gemmatilis* alimentadas com dieta misturada com flutriafol (57%) e, que das pupas resultantes das lagartas sobreviventes, 44% apresentavam algum defeito; em relação ao segundo fungicida, a viabilidade das lagartas foi de 90%, mas 55% das pupas resultantes eram defeituosas. Esses autores observaram, ainda, que a fase larval das lagartas alimentadas com dieta misturada a flutriafol, tetraconazol e tebuconazol foi mais longa do que daquelas alimentadas com dieta pura.

Tanto o ingrediente ativo flutriafol quanto o miclobutanil interferiram negativamente no consumo, afetando, ainda, o desenvolvimento do inseto.

O efeito direto de fungicidas utilizados para controle da ferrugem asiática sobre a lagarta-da-soja pode afetar, de forma indireta, a dinâmica da população e os danos causados por esta praga em lavouras de soja tratadas com esses fungicidas. Esses efeitos devem ser melhor investigados em condições mais próximas às de campo.

Tabela 1. Comparativo de diferentes fungicidas contra a ferrugem asiática da soja misturados à dieta artificial para lagarta da soja.

Ingrediente ativo misturado à dieta	Médias \pm EP ¹			
	Peso seco de dieta consumida (g)	Peso seco de fezes (g)	Peso seco do alimento digerido (g)	Peso de pupa (g)
testemunha (sem fungicida)	0,292 \pm 0,005 a	0,131 \pm 0,005 ab	0,122 \pm 0,014 a	0,175 \pm 0,006 a
epoxiconazol+piraclostrobin	0,268 \pm 0,012 ab	0,137 \pm 0,007 a	0,137 \pm 0,009 a	0,176 \pm 0,007 a
tebuconazol	0,236 \pm 0,013 ab	0,132 \pm 0,008 ab	0,104 \pm 0,007 ab	0,153 \pm 0,008 a
tetraconazol	0,235 \pm 0,018 ab	0,113 \pm 0,007 abc	0,123 \pm 0,012 a	0,126 \pm 0,009 bc
azoxistrobina	0,230 \pm 0,021 ab	0,133 \pm 0,021 ab	0,100 \pm 0,014 ab	0,152 \pm 0,011 ab
miclobutanil	0,220 \pm 0,014 b	0,108 \pm 0,006 bc	0,113 \pm 0,009 a	0,132 \pm 0,009 bc
flutriafol	0,145 \pm 0,021 c	0,087 \pm 0,011 c	0,058 \pm 0,011 b	0,107 \pm 0,011 c
Valor de F	6,097	5,278	3,951	7,195
Prob.	>0,001	>0,001	0,001	>0,001

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Referências

- CORREA, B. S.; SMITH, J. G. *Nomuraea rileyi* attacking the velvet-bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* in Parana , Brazil. **The Florida Entomologist**, v. 58, n. 4: 280, 1975.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; OLIVEIRA, L. J.; CORRÊA, B. S.; PANIZZI, A. R.; GAZZONI, D. L.; SOSA-GOMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 2000. 70 p. (EMBRAPA/CNPSo).
- SOSA-GOMEZ, D. R.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, M. C. N. de; SILVA, S. H. da; SALVADOR, M. C.; SANTOS, A. A. dos Efeito de fungicidas utilizados para controle da ferrugem asiática da soja sobre *Anticarsia gemmatilis* (Hubner). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4, 2006, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2006. p. 85.
- SOSA-GOMEZ, D. R. Aliados sob apuros. **Cultivar**, Pelotas, v. 7, n. 78, p. 22-25, out. 2005.

Processo de criação para peças gráficas

Claudinéia Sussai de Godoy¹; Gilceana Soares Moreira Galerani²; Ana Luisa C. L. Cavalcante³. ¹Aluna de graduação de Desenho Industrial-UNOPAR, neiasussai@yahoo.com.br; ²Embrapa Soja; ³Professora de Ergonomia da Unopar.

Introdução

O design é uma atividade que tem as suas origens na pré-história, com as primeiras representações visuais. Entretanto, somente no final do século XIX é que começa a ganhar autoconsciência.

Formado em desenho industrial com habilitação em projeto de produto ou projeto visual, o profissional de design é uma pessoa voltada para a comunicação e a produção de objetos, livros, revistas e espaços que têm relação com o elemento homem, interagindo com o meio e desenvolvendo produtos que estabelecem uma ligação direta com o usuário e o seu modo de vida.

Não se pode projetar uma cadeira para ter somente a função de decorar, deixando de lado fatores que compõem o processo de desenvolvimento, como a funcionalidade, a durabilidade e a estética. Parece muito fácil projetar um cartaz com ferramentas da informática, e não se preocupar com as questões práticas, estéticas e simbólicas.

Para que o produto se torne um objeto competitivo, o designer trabalha com etapas metodológicas, que devem ser respeitadas para que o desenvolvimento criativo se torne eficaz. Esse processo se dá de diversas maneiras, sobre o olhar de vários autores, no qual todos seguem a mesma linha de raciocínio.

Dividido em quatro etapas, pode-se classificar da seguinte forma: delimitação do problema, acúmulo de dados, incubação e iluminação e, por fim, verificação.

1. **Delimitação do problema:** é necessário que se tenha bem claro o objetivo a ser alcançado, a fim de que o resultado obtido alcance às

necessidades identificadas. É uma etapa importante no processo, pois será a base de desenvolvimento e qualquer falha pode gerar um resultado equivocado.

2. **Acúmulo de dados:** Uma coleta de informações, em forma de pesquisa, é necessária nesta etapa, para visualizar o problema de modo mais abrangente possível. Segundo Melo (2003), é importante destacar o usuário final, também chamado de público-alvo, e conhecer seu perfil é um fator básico para saber em que terreno se está pisando.
3. **Incubação e iluminação:** Após a delimitação do problema e da coleta de dados, é necessário um tempo para que a mente processe tal volume de informação. Assim, as novas informações são experimentadas pela mente, criando a proposta que pode ser explorada. O cérebro continua trabalhando no problema em questão, mesmo enquanto se está com a atenção voltada para um outro assunto. É neste momento que surgem várias idéias, que vêm à mente como respostas às indagações feitas, e as respostas que se procuram são como ouro, que precisa ser descoberto e lapidado.
4. **Verificação:** Depois da iluminação, surge a necessidade de avaliar a idéia. A solução encontrada é melhorada e adaptada e, caso a proposta se torne inviável, deve-se refazer as etapas quantas vezes forem necessárias, para que se chegue a um resultado satisfatório.

O processo de criação facilita o design nas criações de suas peças gráficas, que visa atingir um bom resultado final. Após a aprovação final do projeto pelo cliente, inicia-se mais um processo, o qual chamamos de arte-final, que seria a preparação da peça para sua produção. Sendo peça gráfica ou peça industrial, todas passarão por esse processo, respeitando a respectiva categoria.

Desenvolvimento

O produto a ser desenvolvido é um cartaz para o Dia das Crianças, que constitui em uma peça de comunicação interna, por propor a participação dos funcionários da Embrapa Soja na arrecadação de brinquedos. As crianças presenteadas serão as da Pastoral do Conjunto Saltinho, e a peça

de comunicação interna é parte de um projeto que visa integração com a comunidade da cidade de Londrina, onde a instituição está instalada. O objetivo é despertar a solidariedade e o comportamento social de cada funcionário.

Na delimitação do problema, ficou esclarecido que o público alvo seriam os funcionários e estagiários. O modo de impressão do produto seria jato de tinta, de baixo custo. E o objetivo principal do produto seria despertar a participação do próprio público-alvo.

O acúmulo de dados foi feito com materiais já demandados por outros projetos da instituição, como revistas e brinquedos infantis.

A verificação da idéia foi baseada no estudo da semiótica, que poderá esclarecer pontos entre a relação de imagem verbal e não-verbal.

A importância da leitura da imagem é essencial para um bom desempenho da criação de peças gráficas, pois as imagens impõem presenças que não podem ser ignoradas ou subestimadas em sua potencialidade comunicativa. Assim, afirma Buoro em seu livro: "Ainda mais, porque é fato comprovado que não há quem passe impune pela imagem, recusando-se a ser afetado por sua presença ou perceber os significados mais profundos nela envolvidos". (Buoro, 2002, p. 84).

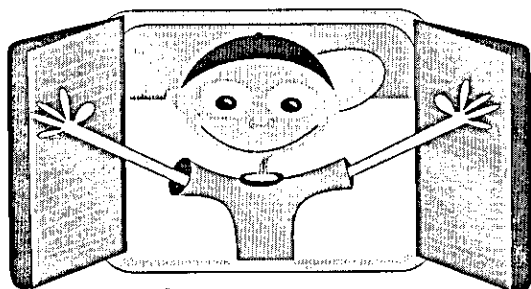
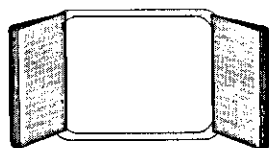
Com isto, a semiótica é, resumidamente, o estudo dos signos, que significa tudo aquilo ou todo aquele que significa, de um modo simplista. (Oliveira, (2005). Signo é algo que representa alguma coisa para alguém em determinado contexto. Portanto, é inerente à constituição do signo, o seu caráter de representação, de fazer presente, de estar em lugar de algo, de não ser o próprio algo. O signo tem o papel de mediador entre algo ausente e um intérprete presente. Dentro da estrutura da semiótica, existem divisões para facilitar a compreensão da leitura, do ícone, do índice e do símbolo. Neste projeto, o produto será representado somente em símbolo que, conforme Niemeyer (2003) é a essência da associação de algo pré-existente.

Baseado no estudo da semiótica, o conceito partiu da idéia de trabalhar com desenhos coloridos. Os símbolos serão visíveis neste projeto, serão apresentados por meio da ilustração de um caderno de colorir com riscos

fáceis; como o público (funcionários), em sua maioria, são pais ou têm crianças em casa, esses desenhos poderão, inclusive, tornarem-se um presente da instituição para os menores.

Verificação da idéia e do conceito

1. A representação do menino sorrindo, como símbolo principal do cartaz, simboliza todas as crianças que serão presenteadas.
2. A janela é o símbolo dos caminhos que se abrem para todos, tanto para as crianças quanto para os doadores que, ao fazerem a doação, estarão se abrindo para uma boa ação.
3. E, por fim, os braços, que fecham o conceito que todas as crianças estarão sempre de braços abertos para receber qualquer ação de carinho, esperança e conforto, pois elas simbolizam a perspectivas de um futuro melhor.
4. Após concluídas as etapas de criação, a proposta é apresentada ao cliente, que poderá solicitar ajustes.
5. Proposta final.



Dia das Crianças

Considerações Finais

Seguindo as etapas de um processo criativo, potencializam-se as soluções que possibilitam atingir os objetivos finais, por meio da minimização de esforços e riscos. Questões práticas, estéticas e simbólicas, com respeito a linguagem das imagens, que fundamentam a criação de uma peça que atenda tanto às necessidades do cliente quanto do consumidor final. Esse relacionamento harmonioso com método e processo criativo é essencial para a eficácia da comunicação visual.

Referências

- BUORO, A. B. **Olhos que pintam: a leitura da imagem e o ensino da arte**. São Paulo: A Leitura da Imagem e o Ensino da Arte, 2002. 253 p.
- NIEMEYER, L. **Elementos de semiótica aplicada ao design**. 1. ed Rio e Janeiro: 2ab, 2003. 69 p.
- OLIVEIRA, S. R. **Imagem também se lê**. 1. ed. São Paulo: Rosari, 2005. 192 p.
- MELO, F. H. de. O processo do projeto. Im: CAMARGO, M.; Sacchetta, V. **O valor do design: guia ADG Brasil de prática profissional do designer gráfico**. São Paulo: SENAC: ADG Brasil, 2003. p. 91-105
- PANIZZA, J. F. **Metodologia e processo criativo em projetos de comunicação visual**. 2004. 254f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Comunicação). Escola de Comunicação e Artes, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Grau de humificação e estoques de matéria orgânica em sistemas de manejo do solo e rotação de culturas

Letícia Carlos Babujia¹; Julio César Franchini¹; D. M. B. P. Milori²; Eleno Torres³.

¹Estudante de graduação do Curso de Química da UEL; ²Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP; ³Pesquisador da Embrapa Soja.

Introdução

O sistema de plantio direto (PD) tem sido amplamente adotado no Brasil, com uma ampliação da área de 2,02 milhões de ha em 1992 para quase 22 milhões de ha atualmente (FEBRAPDP, 2005). Em comparação com o plantio convencional (PC), que envolve o preparo do solo com aração e gradagem, o PD aumenta a retenção de umidade do solo, diminui a oscilação de temperatura e a erosão pela água e vento, melhora a estrutura e, com o tempo, aumenta a matéria orgânica do solo (MOS), muitas vezes resultando em maiores produtividades das culturas (Castro Filho et al., 1991; 2002; Derpsch et al., 1991; Bayer et al., 2002; Sisti et al., 2004). Além disso, o PD pode representar um importante papel na redução do aquecimento global pelo fornecimento de um maior dreno para o CO₂ atmosférico e por economizar até 40% do trabalho humano e de combustíveis fósseis, em comparação com o PC (Derpsch et al., 1991; Bayer et al., 2002; FAO, 2004). A manutenção dos resíduos culturais sobre a superfície do solo e o decorrente aumento da MOS são considerados como os responsáveis pelos efeitos benéficos do PD. No entanto, existem ainda poucas informações sobre a qualidade da MOS acumulada no solo no sistema de PD. Recentemente o uso da fluorescência induzida por laser (FIL) tem demonstrado ser uma técnica promissora para estimativa do grau de humificação da MOS, com grandes implicações para o entendimento da dinâmica da MOS em sistemas agrícolas (Milori et al., 2006).

Objetivos

Avaliar os estoques de C e N e o grau de humificação da MOS em sistemas de manejo do solo e de culturas em experimento de longo prazo na região norte do Paraná.

Materiais e Métodos

O estudo foi conduzido na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná, sobre Latossolo Vermelho distroférrico, muito argiloso (71% argila, 16% silte e 12% areia). O experimento foi iniciado em abril de 1989, e era constituído sob dois sistemas de manejo: plantio direto contínuo (PD) e plantio convencional com arado de discos (PC) e dois sistemas de rotação de culturas: rotação R1- tremoço/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo e rotação R2- trigo/soja. O delineamento experimental é em blocos casualizados com quatro repetições. Em agosto de 2005, durante os cultivos de tremoço e de trigo, respectivamente, haviam sido previamente cultivados em R1 e R2, foram coletadas amostras de solo deformadas e indeformadas, nas camadas de 0-5, 5-10, 10-15, 15-25, 25-35 e 35-50 cm de profundidade. As amostras indeformadas foram coletadas para determinação da densidade do solo utilizada para o cálculo dos estoques de C e N, expressos em Mg/ha. E as amostras deformadas, para determinação de C e N. As repetições experimentais, de aproximadamente 500 mg, foram prensadas em pastilhas de 1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura para estudos de fluorescência induzida por laser (FIL). A área dos picos de fluorescência a 530 nm foi dividida pelo teor de C nas amostras para a estimativa do grau de humificação (H_{FIL}) da MOS. Mais detalhes sobre a técnica e condições analíticas são descritos por Milori et al. (2006).

Resultados e Discussão

Os estoques de C e N foram alterados pelos sistemas de manejo do solo e de culturas (Tabela 1). Considerando os teores de N em todo o perfil de solo (0-50 cm) foi observada a seguinte ordem decrescente de estoques

Tabela 1. Estoques de C e N em sistemas de manejo do solo e rotação de culturas.

Camadas (cm)	N Mg/ha							
	PCR1	PCR2	PDR1	PDR2	R1	R2	PC	PD
0-5	1,30	1,03	1,59	1,36	1,44	1,20	1,16	1,47
5-10	1,26	0,83	1,36	1,23	1,31	1,03	1,05	1,29
10-15	1,28	1,01	1,10	1,16	1,19	1,09	1,14	1,13
15-25	2,06	1,68	1,99	1,93	2,02	1,81	1,87	1,96
25-35	1,21	1,10	1,48	1,52	1,34	1,31	1,16	1,50
35-50	1,45	1,60	1,73	1,76	1,59	1,68	1,52	1,75
N total 0-50	8,55	7,25	9,23	8,97	8,89	8,11	7,90	9,10
contrastes Mg/ha	PDR1-PCR1	PCR2-PCR1	PDR2-PCR2	PDR2-PDR1	R2-R1		PD-PC	
	0,68	-1,30	1,72	-0,26	-0,78		1,20	
N kg/ha/ano (15 anos)	45	-86	114	-17	-52		80	

Camadas (cm)	C Mg/ha							
	PCR1	PCR2	PDR1	PDR2	R1	R2	PC	PD
0-5	12,04	12,72	15,40	17,20	13,72	14,96	12,38	16,30
5-10	11,68	12,12	12,22	13,81	11,95	12,97	11,90	13,01
10-15	11,54	12,19	12,03	11,99	11,79	12,09	11,87	12,01
15-25	18,03	21,12	18,25	18,37	18,14	19,74	19,58	18,31
25-35	11,97	13,57	12,58	13,09	12,27	13,33	12,77	12,83
35-50	17,08	15,81	15,27	21,77	16,18	18,79	16,45	18,52
C total 0-50	82,34	87,54	85,75	96,22	84,05	91,88	84,94	90,98
contrastes Mg/ha	PDR1-PCR1	PCR2-PCR1	PDR2-PCR2	PDR2-PDR1	R2-R1		PD-PC	
	3,40	5,20	8,68	10,47	7,84		6,04	
C kg/ha/ano (15 anos)	227	346	578	698	522		403	

PC: plantio convencional; PD: plantio direto; R1: tremoço/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo/soja; R2: trigo/soja.

de N: $PDR1 > PDR2 > PCR1 > PCR2$. Os contrastes entre tratamentos permitiram avaliar os efeitos dos sistemas de manejo e de culturas sobre os estoques de N no solo. Neste sentido, foram observados aumentos nos estoques de N quando o PD foi comparado ao PC, tanto em R1 (680 kg/ha) quanto em R2 (1720 kg/ha). Por outro lado, foram observadas reduções nos estoques de N no solo quando R2 foi comparada a R1 dentro de um mesmo sistema de manejo. Assim, o estoque de N foi reduzido em 1300 kg/ha em R2 em relação a R1 no PC, enquanto no PD essa redução foi de apenas 260 kg/ha. Quando comparadas às médias dos sistemas de culturas, verifica-se um decréscimo de 780 kg/ha de N em R2 em relação a R1. As médias dos sistemas de manejo do solo indicaram um aumento de 1200 kg/ha de N no PD em relação ao PC, o que significa, considerando o período de 15 anos, uma taxa média de aumento de N de 80 kg/ha/ano. De modo geral, constata-se que o uso de R2 reduziu os estoques de N, particularmente quando associado ao PC.

Os estoques de C, por sua vez, se comportaram de forma inversa à observada para os estoques de N (Tabela 2). Quando considerados os estoques totais (0-50 cm) foi observada a seguinte ordem decrescente: $PDR2 > PCR2 > PDR1 > PCR1$. Esse ordenamento indica que o acúmulo de C esteve associado com sistema R2. O PD também desempenha papel importante na determinação dos estoques, porém o uso de R1 reduz o estoque de C em relação ao PC com o uso de R2. As médias de sistemas de culturas indicaram um acúmulo de 522 kg/ha/ano de C em R2 em relação a R1. No caso dos sistemas de manejo do solo o acúmulo médio foi de 403 kg/ha/ano do PD em relação ao PC. O grau de humificação da MOS também foi influenciado pelos sistemas de manejo do solo e de culturas (Tabela 2).

O H_{LIF} tendeu a aumentar da camada superficial para as camadas mais profundas do solo, em função da adição de restos culturais na superfície do solo. Em relação aos sistemas de manejo do solo, observa-se que o H_{LIF} foi maior no PC em relação ao PD, indicando que a MOS no PC é mais recalcitrante do que no PD. Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da decomposição da MOS lábil com as operações de preparo do solo, de modo que a fração recalcitrante remanescente passa a compreender uma fração maior do estoque de MOS. No caso dos sistemas de

Tabela 2. Grau de humificação da MOS em sistemas de manejo do solo e rotação de culturas.

Camadas (cm)	Grau de humificação (H_{LIF})							
	PCR1	PCR2	PDR1	PDR2	R1	R2	PC	PD
0-5	22	21	18	17	19	20	22	18
5-10	27	23	23	21	22	25	25	22
10-15	25	24	24	25	24	24	24	24
15-25	34	26	28	28	27	31	30	28
25-35	49	37	43	40	39	46	43	42
35-50	57	52	56	36	44	57	55	46

PC: plantio convencional; PD: plantio direto; R1: tremço/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo/soja; R2: trigo/soja.

culturas, o H_{LIF} indicou maior humificação da MOS em R1 em relação a R2, principalmente nas camadas mais profundas do solo. A presença de plantas de cobertura e adubação verde em R1, aumenta a taxa de decomposição da MOS, contribuindo para o aumento do grau de humificação da MOS, em relação a R2 que apresenta apenas culturas comerciais. Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos em outras áreas experimentais e com o uso de outras técnicas (Milorí et al., 2002; 2006; Bayer et al., 2002), mostrando a coerência das observações.

Conclusões

Os estoques de C e N no solo são influenciados pelos sistemas de manejo do solo e das culturas, com o N e o C sendo aumentados com a maior intensidade na rotação e na sucessão de culturas, respectivamente. Quando comparados tanto no plantio direto quanto no convencional. O sistema de manejo do solo determina o estoque de N enquanto o estoque de C é mais influenciado pelo sistema de manejo das culturas. O menor grau de humificação em plantio direto indica maior suscetibilidade a decomposição da MOS acumulada no sistema.

Referências

- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P. R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. **Plant Soil**, v. 238, p. 133 -140, 2002.
- CASTRO FILHO, C.; HENKLAIN, J. C.; VIEIRA, M. J.; CASÃO JUNIOR, R. Tillage methods and soil and water conservation in southern Brazil. **Soil Till. Res.**, 20:271-283, 1991.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; GUIMARAES, M. F.; FONSECA, I. C. B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the State of Parana Brazil. **Soil Till. Res.**, v. 65, p. 45-51, 2002.
- DERPSCH, R.; ROTH, C. H.; SIDIRAS, N.; KOPKE, U. **Controle da Erosão no Paraná, Brasil: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo**. Londrina: GTZ – IAPAR, 1991. p. 272.
- SISTI, C. P. J.; DOS SANTOS, H. P.; KOHHANN, R.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil Till. Res.** v. 76, p. 39-58, 2004.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, p. 739-749, 2002.
- MILORI, D. M. B. P.; GALETI, H. V. A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZALEZ-PEREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 70(1), p. 57-63, 2006. .

Distribuição de carbono e estabilidade de agregados em amostras indeformadas de diferentes sistemas de rotação de culturas em plantio direto

Thalita Aline Silvério Molitor¹; Eleno Torres²; Julio César Franchini². ¹Estudante de graduação do Curso de Química da UEL; ²Pesquisador da Embrapa Soja.

Introdução

A matéria orgânica do solo (MOS) é a principal responsável pela formação e estabilidade de agregados, que por sua vez, determinam maior resistência do solo à erosão e uma estrutura mais adequada para o estabelecimento e desenvolvimento das culturas. O manejo inadequado, com excessivo revolvimento, pode causar uma rápida deterioração da estrutura devido à desorganização do ambiente do solo e o conseqüente aumento na oxidação da MOS. A agregação do solo e a dinâmica de formação de agregados são importantes em vários aspectos: proteção da física da MOS, fornecimento adequado de água e oxigênio para as raízes, fornecimento de microhabitats para a macro e microfauna do solo e formação de poros de maior diâmetro que favorecem a infiltração de água reduzindo o escoamento superficial e a erosão. A adoção de sistemas de manejo com menor revolvimento do solo tem sido indicada para a recuperação dos teores de MOS e da estabilidade estrutural de solos degradados pelo uso do plantio convencional (Castro Filho et al., 2002; Madari et al., 2005). No entanto, existem poucas informações sobre o efeito dos sistemas de rotação de culturas em plantio direto sobre a estabilidade estrutural do solo.

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de sistemas de rotação de culturas em plantio direto sobre a dinâmica de agregação e distribuição de carbono em agregados.

Desenvolvimento

A dinâmica de agregação foi avaliada em experimento de longa duração estabelecido na fazenda experimental da Cooperativa COPACOL, em Cafelândia, PR. Foram amostrados tratamentos sob plantio direto contínuo desde 1991 com as seguintes rotações de culturas: 1) trigo/soja/trigo/soja/trigo/soja/trigo/soja e 2) nabo/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo/soja. Em agosto de 2005, foram coletadas amostras indeformadas de solo nas camadas de 0-5 e 5-10 cm. As amostras foram coletadas em recipientes plásticos com dimensões de 11 cm x 11 cm x 3 cm (largura, comprimento e altura, respectivamente). Os blocos foram saturados durante 20 minutos e transferidos para a peneira superior de um conjunto constituído por peneiras com abertura de malha decrescente, 8,00; 4,00; 2,00; 1,00 e 0,50 mm. As peneiras estavam contidas em um recipiente com água e foram submetidas à oscilação vertical de 5 cm numa taxa de 30 ciclos por minutos, durante 30 minutos. A seguir, o solo retido em cada peneira foi separado. A fração < 0,50 mm foi passada por peneira de malha de 0,053 mm e a suspensão resultante foi floculada com CaCl_2 . Todas as frações foram secadas, pesadas, moidas e analisadas quanto ao seu teor de carbono (C) por oxidação com dicromato em meio ácido. A massa dos agregados foi utilizada para o cálculo do diâmetro médio geométrico (DMG) segundo Schaller & Stockinger (1953).

Resultados

A estabilidade de agregados foi alterada pelos sistemas de rotação de culturas (Figura 1). O sistema de rotação 2 apresentou maior proporção de agregados nas classes > 2,00 do que o sistema 1, independente da profundidade avaliada. Nas classes < 2,00 a posição entre os sistemas foram invertidas. As classes mais alteradas pelos sistemas de rotação de culturas foram as de agregados > 8,00 mm e de 0,5-0,053 mm. A distribuição de agregados proporcionou os seguintes valores de DMG: 1,21; 1,24; 1,39 e 1,41 mm, para os sistemas 1 e 2, nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm, respectivamente (Figura 2). A estabilidade de agregados expressa pelo DMG dos agregados foi 14% maior no sistema 2 em relação ao 1. Deste

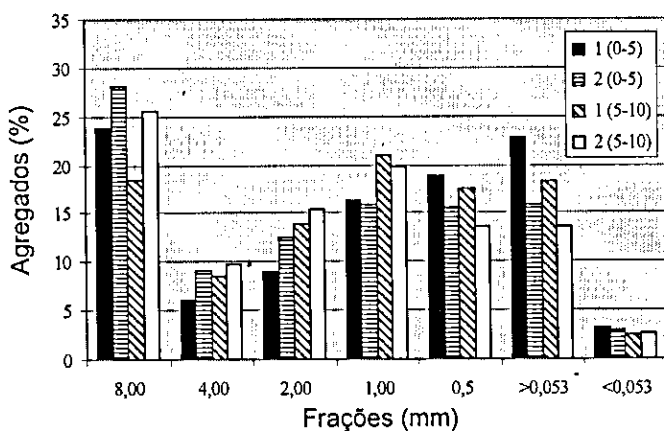


Figura 1. Distribuição das classes de agregados em sistemas de rotação de culturas em plantio direto. 1: trigo/soja; 2: nabo/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo/soja. Profundidades: 0-5 e 5-10 cm.

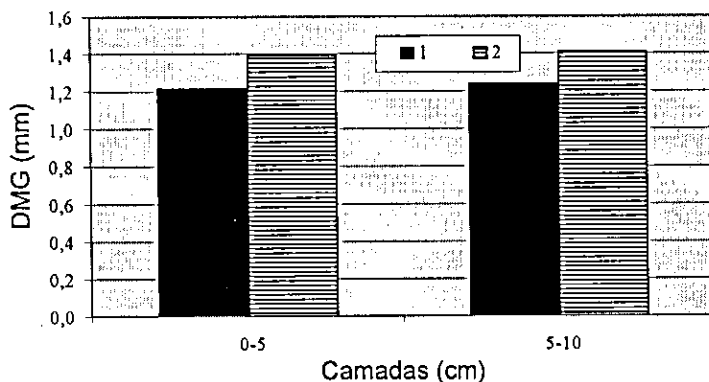


Figura 2. Diâmetro médio geométrico (DMG) em sistemas de rotação de culturas em plantio direto. 1: trigo/soja; 2: nabo/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo/soja. Profundidades: 0-5 e 5-10 cm.

modo, a monocultura trigo/soja proporcionou uma redução do DMG dos agregados em relação a rotação de culturas.

A distribuição do C entre as classes de agregados seguiu a mesma tendência observada para a estabilidade das classes, sendo, portanto, maior a

quantidade de C no sistema de rotação 2 em relação ao sistema de rotação 1, independente da profundidade considerada (Figura 3).

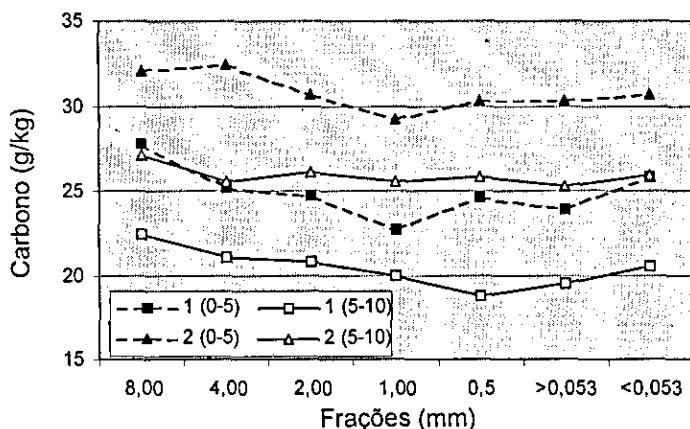


Figura 3. Distribuição de carbono nas frações de agregados em sistemas de rotação de culturas em plantio direto. 1: trigo/soja; 2: nabo/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo/soja. Profundidades: 0-5 e 5-10 cm.

Independente do sistema de rotação o teor de carbono nas frações >1,00 mm aumentou com o diâmetro das frações indicando que para estas frações o C é o principal responsável pela formação dos agregados. O comportamento do sistema de rotação 2 demonstra que a maior diversidade de espécies contribuiu para a melhoria na estabilidade de agregados. Esse comportamento pode estar associado com as alterações induzidas pelo carbono no ambiente físico e biológico que contribuem para a estabilização dos agregados. Para as frações < 1,00 o teor de C aumentou com a diminuição do diâmetro da fração. Esse comportamento sugere que para estas frações, outros mecanismos, além daqueles relacionados ao carbono, estão envolvidos na estabilização dos agregados. O sistema 2 acumulou em média 24% a mais de carbono nas frações > 1,00 do que o sistema 1. A estabilidade de agregados e a distribuição de carbono indicam que a rotação de culturas foi mais efetiva na estabilização de agregados e no acúmulo de carbono do que a sucessão trigo/soja.

A coleta de blocos indeformados de solo para determinação da estabilidade de agregados permitiu a identificação de duas classes potencialmente afetadas pelo manejo: $> 8,00$ e $0,5-0,053$ mm. A vantagem deste método é que ele não altera a disposição natural dos agregados no solo como outros métodos que fazem pré-seleção de agregados no campo e acaba selecionando agregados de maior diâmetro (Madari et al., 2005). Outra vantagem do método, foi a possibilidade de observar de forma clara a participação do C na estabilização de agregados $> 1,00$, que por outros métodos tem sido atribuída apenas a agregados $> 4,00$.

Considerações Finais

A estabilidade de agregados é favorecida pelo aumento do carbono e da diversidade de espécies em sistemas de rotação de culturas em plantio direto.

Referências

- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; GUIMARAES, M. F.; FONSECA, I. C. B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the State of Parana, Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 65, p. 45-51, 2002.
- MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A.; TORRES, E.; ANDRADE, A. G.; VALENCIA, L. I. O. No tillage and crop rotation effects on soil aggregation and organic carbon in a Rhodic Ferralsol from southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 80, p. 185-200, 2005.
- SCHALLER, F. W.; STOCKINGER, K. R. A comparison of five methods for expressing aggregation data. **Soil Science Society of America Proceedings**, v. 17, p. 310-313, 1953.

Estoques e origem de carbono em sistemas de rotação de culturas após 20 anos de plantio direto

Thaís Portantiolo Correa Porto¹; Julio César Franchini²; Eleno Torres². ¹Estudante do curso de química da UEL; ²Embrapa Soja, franchin@cnpso.embrapa.br

Introdução

No Estado do Paraná, o sistema de plantio direto chega a ser utilizado em 70% das áreas agrícolas. Particularmente no Centro-oeste do estado, região de forte atuação da Cooperativa Agrícola Mourãoense (COAMO), aproximadamente 500.000 ha são cultivados sob o sistema de plantio direto. A Embrapa Soja vem conduzindo experimento de rotação de culturas em plantio direto na região desde 1985. Esse tipo de experimento é de extrema importância para o entendimento da dinâmica da matéria orgânica no plantio direto, pois fornece informações de longo prazo. A adoção do plantio direto associada ao uso de sistemas de rotação de culturas, incluindo milho e leguminosas de inverno, tem proporcionado aumentos nos estoques de carbono do solo na Região Sul do País (Bayer et al., 2002; Sisti et al., 2004). No entanto, informações desse tipo são incipientes no Paraná.

Objetivo

Avaliar os estoques de carbono e sua origem em sistemas de rotação de culturas após 20 anos de plantio direto na região centro-oeste do estado.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido na Fazenda Experimental da Cooperativa Agrícola Mourãoense, em Campo Mourão, PR (24°03'S e 52°22'W, 616 metros de altitude). O local apresenta precipitação média anual de 1400 mm e

temperatura média anual de 20,5 °C. O solo no local foi classificado como Latossolo Vermelho distroférrico, muito argiloso (710 E'g/Kg argila, 220 E'g/Kg silte e 70 E'g/Kg areia). O experimento foi iniciado em abril de 1985, quando a área previamente cultivada com cafeeiros (desde 1971) foi preparada com o revolvimento do solo para a implantação dos sistemas de rotação de culturas e início do sistema de plantio direto. O experimento é constituído de 12 sistemas de rotação de culturas envolvendo soja, milho, trigo, aveia, nabo forrageiro, ervilhaca, tremoço e outras espécies. Para este estudo, em maio de 2005 foram selecionados dois sistemas de interesse: R1 (tremoço/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo, cinco ciclos em 20 anos) e R2 (trigo/soja, 20 anos). O delineamento experimental foi blocos casualizados, com quatro repetições. Em maio de 2005, quando a soja havia sido previamente cultivada nas três rotações, foram coletadas amostras deformadas e indeformadas nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40 e 40-50 cm de profundidade. As amostras indeformadas foram coletadas em trincheiras (0,5x0,5x0,6 m) com cilindros de aço de 100 cm³. Três amostras foram coletadas por camada e secas a 105°C por 72 h para determinação da densidade do solo. As amostras deformadas compostas, para determinação de C e abundância isotópica (¹³C), eram constituídas de cinco subamostras, por parcela, coletadas com trado do tipo holandês. As amostras foram secas ao ar e peneiradas a 2 mm. Subamostras foram moídas novamente para diâmetro <0,15 mm. Aliquotas contendo entre 200 a 400 mg de C total foram analisadas quanto a abundância de ¹³C usando um espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (Finnigan DeltaPlus mass spectrometer) acoplado a analisador de C (Carlo Erba EA 1108).

Resultados

A abundância natural de ¹³C dos resíduos C3 pode variar entre -27,0 a -28,0, para espécies como soja, trigo, tremoço e aveia, enquanto para as espécies C4, como o milho, fica em torno de -12,0 (Sisti et al., 2004). No presente estudo a diferença na abundância de ¹³C entre a camada superficial e a de 40-50 cm foi de, aproximadamente, 5 ‰ menos negativa, variando de -21,9 a -16,6 para R1 e de -22,7 a -16,8 para R2

(Tabela 1). Esses dados sugerem que nos últimos 20 anos a vegetação foi predominantemente C3 na área experimental, porém houve uma grande proporção de plantas C4 antes do período experimental. Referências históricas descrevem que a região de “Campos de Mourão” era bordejada de matas atlântica e de araucárias, porém a vegetação predominante era de pastagens naturais e cerrado nativo, o que justificaria uma marcação tão negativa do carbono nas camadas mais profundas do solo.

As diferenças em $\delta^{13}\text{C}$ (δ letra grega delta, que significa desvios em relação ao padrão) entre rotações eram esperadas, em função da presença de milho, uma planta C4, em R1 e a presença de apenas espécies C3 em R2 (Tabela 1). O fato do $\delta^{13}\text{C}$ ser mais enriquecido em R1, nas camadas de solo até 20 cm, em relação a R2, indica incorporação de resíduos da espécie C4 na matéria orgânica do solo. Abaixo de 20 cm as diferenças entre as rotações foram praticamente inexistentes.

Utilizando o procedimento de Balesdent et al. (1990), foi possível estimar a abundância de ^{13}C no carbono da MOS do solo na área no início do experimento há 20 anos, para R1 (tremoço/milho/aveia/soja/trigo/soja/trigo) e R2 (trigo/soja). As regressões entre $\delta^{13}\text{C}$ e $1/\text{C}$ para as rotações são apresentadas na Figura 1. A regressão para R2 rendeu um valor de intercepto de $-28,3$ para a abundância de ^{13}C nos resíduos das culturas do sistema, soja e trigo, o que está de acordo com os valores médios observados por Sisti et al. (2004). Para a R1 o valor de intercepto foi $-27,2$, demonstrando a contribuição do resíduo de C4 (ML, milho verão em R2, cinco vezes em 20 anos), para o valor de $\delta^{13}\text{C}$ da mistura de espécies nesta rotação.

A estimativa de $\delta^{13}\text{C}$ da matéria orgânica do solo antes do início do experimento foi obtida no cruzamento das regressões de R1 e R2 e indicou um $\delta^{13}\text{C}$ de $-16,1$. Esse valor de $\delta^{13}\text{C}$ para a matéria orgânica antes do experimento e dos resíduos em cada rotação ($-27,2$ e $-28,3$ para R1 e R2, respectivamente), foram utilizados para estimar a proporção de C derivado das misturas de resíduos em cada rotação.

Para R1 e R2 o carbono dos resíduos contribuiu com 46% e 54% do carbono total na camada de 0-5 cm, respectivamente. A contribuição foi reduzida rapidamente com a profundidade, representando apenas 6%, para ambas as rotações na camada mais profunda avaliada (40-50 cm). A contribuição

Tabela 1. Teor e estoque de C, abundância isotópica e origem do C da matéria orgânica do solo em Campo Mourão.

	C g kg ⁻¹	$\delta^{13}\text{C}$	Ds g cm ⁻³	C ¹ orig			C ² resid		
				%			mg ha ⁻¹		
0-5	29,0	-21,9	1,06	0,48	0,52	15,4	7,43	7,99	
5-10	23,7	-19,8	1,19	0,66	0,34	14,1	9,25	4,90	
10-20	22,4	-20,2	1,17	0,63	0,37	26,2	16,40	9,81	
20-30	19,5	-18,2	1,17	0,81	0,19	22,9	17,90	4,98	
30-40	14,1	-17,5	1,08	0,88	0,12	15,2	13,30	1,98	
40-50	13,3	-16,6	1,04	0,94	0,06	12,4	11,60	0,74	
Total						106,2	75,80	30,4	
Taxa ³ kg/ha/ano (R2-R1)						-334	-108	-226	
0-5	33,5	-22,7	1,02	0,46	0,54	17,1	7,9	9,23	
5-10	25,8	-21,7	1,20	0,54	0,46	15,5	8,3	7,17	
10-20	23,8	-21,1	1,20	0,59	0,41	28,5	16,8	11,70	
20-30	19,1	-18,7	1,18	0,79	0,21	22,5	17,7	4,80	
30-40	15,6	-16,9	1,09	0,93	0,07	16,9	15,8	1,20	
40-50	13,7	-16,8	1,03	0,94	0,06	12,3	11,5	0,72	
Total						112,9	78,0	34,9	

¹ Carbono derivado da matéria orgânica original;

² carbono derivado dos resíduos vegetais;

³ estoque em R2-R1/20 anos.

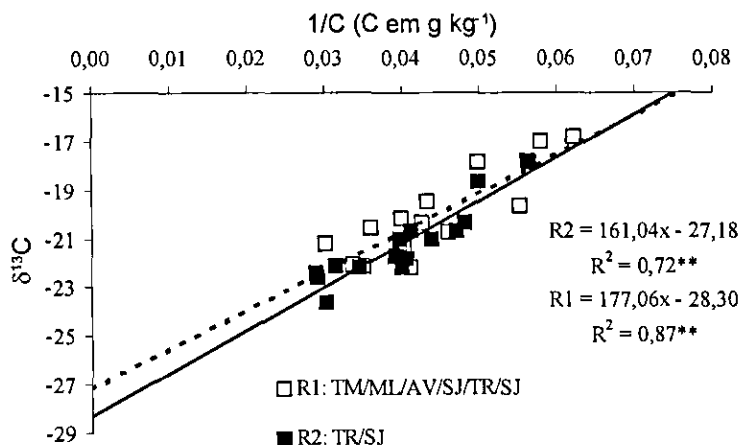


Figura 1. Regressões da recíproca da concentração de C (C em g kg⁻¹ de solo) versus a abundância de ¹³C para as amostras de solo coletadas até 30 cm de profundidade sob 2 sistemas de rotação de culturas (R1-TM/ML/AV/TR/SJ/TR/SJ e R2-TR/SJ) em plantio direto.

dos resíduos foi sempre maior em R2 em relação a R1, o que indica menor conservação relativa de C na última.

Em relação aos estoques de C nas rotações, observa-se que R1 contribuiu para a redução da matéria orgânica do solo em relação a R2 (-334 kg/ha/ano em 20 anos) (Tabela 1).

Conclusão

A presença de leguminosa de inverno em sistema de rotação de culturas contribuiu para a redução do estoque de C no solo em sistema de plantio direto consolidado.

Referências

BALESDENT, J.; MARIOTTI, A.; BOISGONTIER, D. Effect of tillage on soil organic carbon mineralization estimated from ¹³C abundance in maize fields. *Journal Soil Society*. 41, 587–596, 1990.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P. R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. **Plant Soil**, v. 238:p.133-140, 2002.

SISTI, C. P. J.; DOS SANTOS, H. P.; KOHHANN, R.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 76:p .39-58, 2004.

Scarabaeoidea em fragmentos florestais, Londrina, PR

Vanesca Korasaki^{1,2}; George Gardner Brown²; José Lopes³. ¹Departamento de Agronomia, vanesca@cnpso.embrapa.br; ²Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina; ³Embrapa Soja.

Introdução

Besouros da superfamília Scarabaeoidea são utilizados como grupo indicador em estudos sobre diversidade de insetos, também sendo considerados importantes em estudos de impacto de fragmentação florestal, uma vez que o alimento de grande parte desse grupo (raízes, resíduos vegetais, fezes e carcaças) é produzido por organismos fortemente afetados por este processo (árvores, primatas e outros mamíferos de grande porte e pássaros); [Lovejoy et al. (1986), citado por Thomazini & Thomazini (2000)]. Esses besouros também participam na reciclagem de nutrientes do solo, no controle de alguns parasitas de vertebrados e na dispersão de sementes Klein, (1989).

Excrementos e carcaças de animais são recursos alimentares que concentram grande quantidade de energia. Por isso, são utilizados por vários grupos de artrópodes, entre eles muitos besouros, principalmente os Scarabaeidae (Medri & Lopes, 2001b). Desta forma, um método apropriado para monitorar a abundância de insetos dessa família consiste em colocar armadilhas de queda iscadas com excrementos, carcaças ou frutos em decomposição, as quais são enterradas Favila & Halffter, (1997).

Este trabalho teve como objetivos: identificar as espécies existentes em diferentes fragmentos florestais; verificar a flutuação populacional dos Scarabaeoidea, ao longo do ano; separar grupos com diferentes hábitos alimentares; e verificar a relação desses parâmetros com o grau de interferência antrópica dos fragmentos.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado em três fragmentos florestais, em Londrina, PR, com diferentes tamanhos e nível de interferência antrópica: Parque Estadual Mata dos Godoy (MG), com área de 680 ha, Parque Municipal Arthur Thomas (AT) que possui 85,5 ha e o Horto Florestal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com 10 ha, em Londrina, PR.

O fragmento MG, considerado mais conservado neste estudo, localiza-se fora do perímetro urbano de Londrina, possuindo cobertura vegetal contínua em boas condições de preservação e exemplares de fauna e flora típica do Norte do Paraná. O Parque AT, considerado de nível intermediário de interferência antrópica, localiza-se dentro do perímetro urbano e é composto de vegetação secundária remanescente da floresta original. O Horto da UEL, considerado mais perturbado apresenta vegetação secundária e recebeu diversos reflorestamentos para auxiliar a recomposição da sua flora.

O clima da região, segundo Köppen, é do tipo Cfa, ou seja, subtropical úmido, com chuvas em todas as estações, podendo ocorrer secas no período de inverno (Mendonça, 2000). A temperatura média do mês mais quente é superior a 24°C e a do mês mais frio, inferior a 14°C; a média de pluviosidade anual é de 1686 mm.

As coletas foram realizadas com armadilhas de solo, do tipo "pitfall trap" e consistiram de um recipiente plástico de 23,0 cm de altura e 9,5 cm de diâmetro. Na borda superior de cada recipiente, foi acoplado um pequeno frasco, servindo como porta-isca. A tampa do recipiente da isca foi crivada de furos para permitir a exalação do odor da isca em decomposição e, em cada armadilha, foi adicionado 200 ml de formalina a 1% v/v.

Em cada fragmento, foram instaladas dez armadilhas, com quatro tipos de isca (carne, banana e sardinha apodrecidos e fezes), além das testemunhas (n=2 de cada tratamento). As armadilhas permaneceram sete dias no campo em cada mês, durante o período de setembro de 2005 a julho de 2006. Os *Scarabaeoidea* coletados foram montados em alfinetes entomológicos, separados em morfo-espécies, identificados até o nível de gênero, sendo que uma amostra de cada morfo-espécie foi enviada a taxonomista para identificação da espécie.

Resultados e Discussão

Foram coletados 7304 espécimes de Scarabaeoidea, sendo 3324 deles (46%) na MG, 2562 (35%) na UEL e 1418 (19%) em AT.

A distribuição dos besouros, durante o período de coletas (Figura 1), revela um pico de abundância em todos os fragmentos no mês de novembro, quando normalmente ocorre a emergência e as revoadas destes insetos. Nos meses de inverno, houve redução da captura dos Scarabaeoidea, devido à condição climática mais seca e fria, típica da região Norte do Paraná.

Em todos os ambientes de coleta, a maioria das espécies obtidas foi representada por poucos indivíduos. Segundo Halfter (1991), essa distribuição em que poucas espécies são muito abundantes e muitas espécies são representadas por um número restrito de indivíduos é característica de florestas tropicais. Embora os resultados obtidos na atual pesquisa mostrem essa tendência, o uso de atrativos em iscas, pode mudar artificialmente a abundância de espécies mais atraídas e móveis (Medri & Lopes, 2001a).

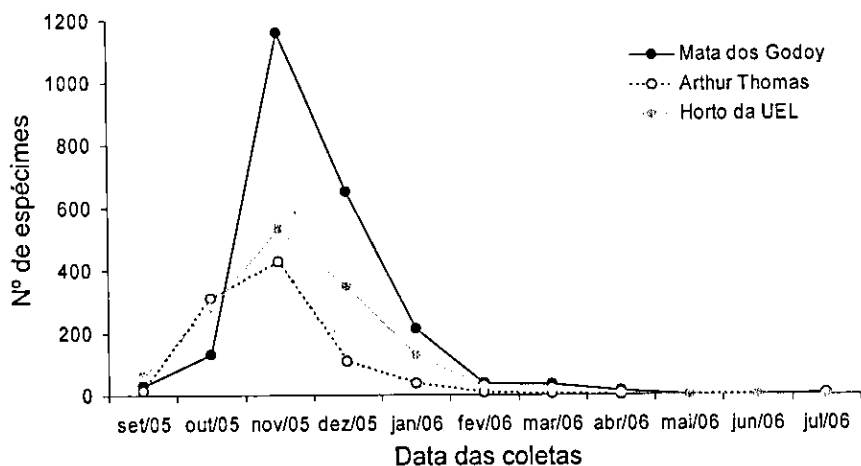


Figura 1. Número total de besouros da superfamília Scarabaeoidea, coletados em armadilhas de solo iscadas ou não, em cada um dos fragmentos de mata (Londrina, PR), durante o período de setembro de 2005 a julho de 2006.

Das iscas usadas, sardinha e carne em decomposição tiveram atratividade parecida, ambas sendo responsáveis pela coleta de 3411 (47%) e 3115 (43%) do total, respectivamente. As fezes suínas, bananas fermentadas e a testemunha tiveram baixa atratividade (Figura 2). No entanto, quando se distribui por mês a atratividade entre carne e sardinha variou, sendo que, nos meses de setembro, outubro e maio a carne atraiu mais besouros (Figura 3).

O gênero *Dichotomius* totalizou 95 indivíduos, sendo 54 na MG, 36 na UEL e 5 no AT. Nesse gênero, 31 espécimes (33%) foram capturados em isca de banana fermentada, 27 em fezes (28%), 17 em carne (18%), 15 em sardinha (16%) e 5 na testemunha (6%). Esses resultados mostram a preferência desse gênero por frutos em decomposição, além da sua capacidade de usar outros recursos (onivoria), quando frutos não estão disponíveis no ambiente. O gênero *Trox* ocorreu apenas na MG e na UEL, totalizando 19 indivíduos da mesma espécie. O gênero *Coprophanaeus* apresentou 143 indivíduos, *Deltochilum* 579, *Onthophagus* 37, *Helocephalus* 7, *Canthon* 69, *Thichillum* 14, *Canthidium* 45, *Scybalocanthon* 69 e *Eurysternus* 59 indivíduos, entre outros.

O gênero *Coilodes* foi o mais numeroso, totalizando 5550 (76,10%) dos indivíduos totais, coletados entre setembro e abril. *Coilodes* sp.1 ocorreu

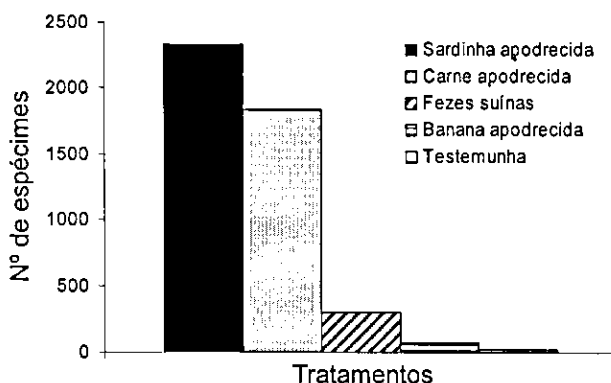


Figura 2. Número total de besouros da superfamília Scarabaeoidea, coletados em armadilhas de solo escada ou não, nos três fragmentos de mata (Londrina, PR), durante o período de setembro de 2005 a julho de 2006.

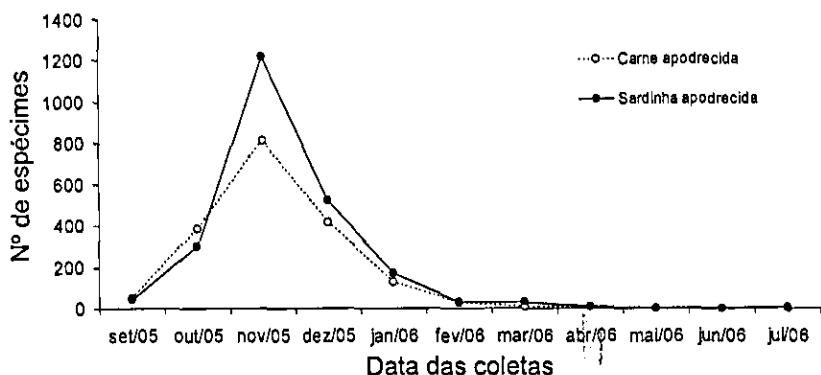


Figura 3. Número de besouros da superfamília Scarabaeoidea coletados em armadilha de solo com dois tipos de iscas, nos três fragmentos de mata (Londrina, PR), durante o período de setembro de 2005 a julho de 2006.

em todas as iscas e fragmentos, totalizando 1019 indivíduos, dos quais 619 na isca de carne (61%), 327 em sardinha (32%), 52 em fezes suínas (5%), 17 em banana fermentada (2%) e dois na testemunha (<1%). Na MG, foram 31 exemplares (3%), no AT 385 (38%) e na UEL 603 (59%).

Portanto, os Scarabaeoidea foram mais abundantes no fragmento florestal mais conservado, confirmando o potencial destes invertebrados como indicadores ambientais. O uso de carne e sardinha apodrecida parece ser o melhor para coletar Scarabaeoidea, porém diversos tipos de isca devem ser usados para coletar outras espécies, se o estudo pretende avaliar a diversidade desses animais no ambiente.

Agradecimentos

À equipe técnica de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina e de Entomologia, da Embrapa-Soja.

Referências

FAVILA, M. E.; HALFFTER, G. The use of indicator groups for measuring

biodiversity as related to community structure and function. **Acta Zoológica Mexicana**, México, v. 72, p. 1-25, 1997.

HALFFTER, G. Historical and ecological factors determining the geographical distribution of beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). **Folia Entomológica Mexicana**, v. 82, p. 195-238, 1991.

KLEIN, B. C. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in Central Amazonia. **Ecology**, v. 70, n. 6, p. 1715-1725, 1989.

MEDRI, I. M.; LOPES, J. Coleopterofauna em floresta e pastagem no norte do Paraná, Brasil, coletada com armadilha de solo. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, n. (Supl. 1), p. 125-133, 2001a.

MEDRI, I. M.; LOPES, J. Scarabaeidae (Coleoptera) do Parque Estadual Mata dos Godoy e Área de Pastagem, no norte do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, n. (Supl.1), p. 135-141, 2001b.

MENDONÇA, F. A. Atipologia climática: Gênese, características e tendências, In: STIPP, N. M. F. (Ed.), **Macrozoneamento ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi (PR)**. Londrina: UEL, 2000, p. 21-62.

THOMAZINI, M. J.; THOMAZINI, A. P. B. W. **A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 21 p. (Embrapa Acre. Documentos, 57).

Macroinvertebrados de solo em fragmentos florestais, Londrina-PR

Vanesca Korasaki^{1,2}; George Gardner Brown²; José Lopes³; Amarildo Pasini¹; Sabrina Dionízio Pereira^{1,2}. ¹Departamento de Agronomia, vanesca@cnpso.embrapa; ²Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina; ³Embrapa Soja.

Introdução

A conservação da biodiversidade é um dos grandes desafios atuais, em função do elevado nível de perturbação antrópica aos ecossistemas naturais e a fragmentação destes sistemas (Viana & Pinheiro, 1998). O crescente interesse nesta área de pesquisa é devido à constatação de que, hoje, a maior parte da biodiversidade se encontra localizada em pequenos fragmentos florestais.

O Estado do Paraná sofreu uma grande devastação de sua cobertura vegetal nativa e, na região Norte, restam apenas alguns fragmentos de florestas circundados por terras cultivadas ou pastagens (Medri & Lopes, 2001).

A macrofauna compreende os maiores invertebrados que vivem no solo e são visíveis a olho nu, com o tamanho do corpo maior que 1 cm (Lavelle et al., 1997) e/ou com diâmetro do corpo acima de 2 mm (Swift et al., 1979). Sua diversidade e abundância podem ser usadas como indicadores de impactos ambientais e da qualidade do ambiente (Paoletti, 1999). Dentre estes, as minhocas se apresentam como bons bioindicadores, sendo que algumas espécies são sensíveis a perturbações e podem desaparecer, enquanto outras se adaptam e se multiplicam em ambientes perturbados.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as populações de macroinvertebrados de solo e seu uso como bioindicadores de perturbação, em três fragmentos florestais com diferentes níveis de interferência antrópica em Londrina-PR.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado em três fragmentos florestais, em Londrina, PR, com tamanho e nível de interferência antrópica diferentes: Parque Estadual Mata dos Godoy (MG), que apresenta área de 680 ha, Parque Municipal Arthur Thomas (AT), que possui 85,5 ha, e Horto Florestal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com 10 ha, em Londrina, PR.

O fragmento MG, considerado o mais conservado neste estudo, localiza-se fora do perímetro urbano de Londrina e possui cobertura vegetal contínua em boas condições de preservação, incluindo exemplares de fauna e flora típica do Norte do Paraná. O Parque AT, considerado de nível intermediário de perturbação, localiza-se dentro do perímetro urbano e é composto de vegetação secundária remanescente da floresta original. O Horto da UEL, considerado o mais perturbado, apresenta vegetação secundária e recebeu diversos reflorestamentos para auxiliar na recomposição da sua flora.

O clima da região, segundo Köppen, é do tipo Cfa, ou seja, subtropical úmido, com chuvas em todas as estações, podendo ocorrer secas no período de inverno (Mendonça, 2000). A temperatura média do mês mais quente é superior a 24° C e a do mês mais frio, inferior a 14° C, a média pluviométrica anual é de 1686 mm.

As coletas foram realizadas pelo Método do TSBF (Anderson & Ingram, 1993), que consiste na retirada de blocos de solo de 25 x 25 cm. Em cada área, foram coletados 25 monólitos, sendo 20 na profundidade de 0-10 cm e cinco de 0-30 cm (divididos em camadas de 10 cm). Os blocos na maior profundidade foram coletados na diagonal da área, que possuía extensão de 1600 m². Entre cada monólito foi mantida uma distância de 10 m. As coletas foram realizadas na época seca (agosto) e chuvosa (dezembro) de 2005. Toda a macrofauna foi quantificada, identificada e pesada em balança de precisão. Para verificar a diversidade foi aplicado o Índice de Shannon e de diversidade de grupos taxonômicos.

Resultados e Discussão

Os dados acumulados de chuva da época seca (junho a agosto) somam 114,6 mm e da época de chuva (outubro a dezembro) somam 503,3 mm.

AT apresentou a maior densidade de minhocas, tanto na época seca (477 indivíduos. m^{-2}) como na época úmida (1218 indivíduos. m^{-2}). Na época chuvosa, 70% das minhocas estavam na camada de 0-10 cm, enquanto que, na época seca, apenas 15% das minhocas estavam nesta camada. Observou-se o mesmo fenômeno em MG, mas na UEL as minhocas foram mais abundantes na camada superficial em ambas as épocas de coleta (Figura 1).

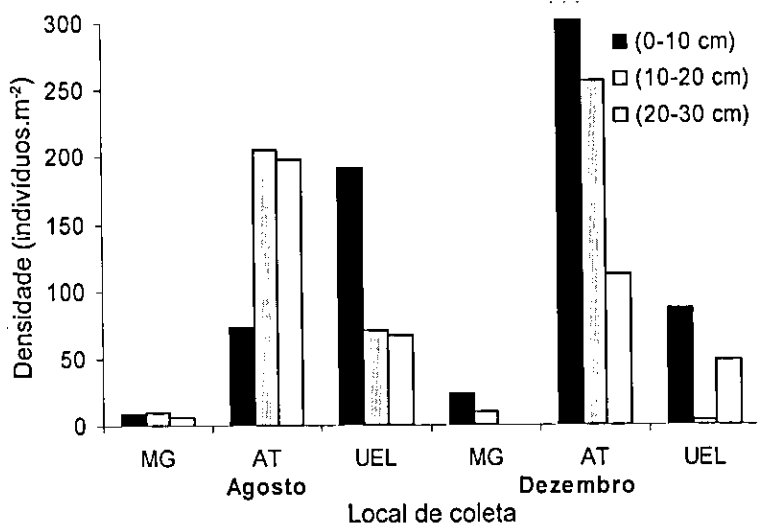


Figura 1. Densidade (indivíduos. m^{-2}) de minhocas em três fragmentos e diferentes profundidades do solo, em agosto (seca) e dezembro (chuva) de 2005, Londrina, PR.

MG apresentou a menor densidade de minhocas. Nessa mata encontraram-se apenas espécies nativas (*Urobenus brasiliensis*, *Urobenus* sp., *Glossoscolex* spp. e *Fimoscolex* sp.) e pequenas, indicadoras de ambientes mais preservados. Em contraste, na UEL e no AT, encontraram-se principalmente espécies exóticas (*Amyntas gracilis* e *Pontoscolex corethrurus*), indicadores de ambientes perturbados. Além destas, encontrou-se também outras espécies exóticas (*Dichogaster* spp.), e as nativas *U. brasiliensis*, *Fimoscolex* sp., *Glossoscolex* sp. e *Belladrilus* sp.

O Índice de Shannon não diferiu entre os fragmentos para a época seca, mas diferiu entre as coletas (seca e úmida). Na época úmida, os fragmentos MG e AT tiveram maior diversidade que a UEL. Em MG, também houve menor variação entre as épocas de coleta (Tabela 1). Em relação à diversidade de grupos por profundidade (Tabela 2), MG foi o fragmento que apresentou maior estabilidade entre as coletas na época seca e úmida (especialmente, nas profundidades de 0-10cm e 10-20cm), corroborando os dados do Índice de Shannon.

Na coleta da época seca, o maior número de macroinvertebrados foi encontrado em AT, principalmente devido às formigas, que representaram

Tabela 1. Densidade de Macroinvertebrados (indivíduos. m⁻²), em três fragmentos de floresta, em agosto e dezembro de 2005, Londrina, PR.

Classificação	Densidade de macrofauna (Indivíduos.m ⁻²)					
	Agosto/2005			Dezembro/2005		
	MG	AT	UEL	MG	AT	UEL
Araneae	54	38	35	31	13	9
Chilopoda	104	63	81	108	42	13
Coleoptera Adulto	68	40	76	198	59	50
Coleoptera Larva	67	65	47	80	131	59
Diplopoda	71	17	48	52	4	42
Diplura	27	13	8	24	6	1
Díptera	375	80	47	30	24	14
Formicidae	996	1900	1265	777	330	223
Gastropoda	29	4	10	15	2	5
Hemiptera	32	21	28	14	9	5
Isoptera	550	612	331	508	267	38
Oligochaeta	26	648	447	37	1222	159
Pseudoesconidae	5	5	4	1	0	1
Outros	120	112	216	122	91	88
Total	2523	3618	2640	1998	2201	708
H'	1,63a	1,64a	1,63a	1,40b	1,26b	0,78c

* Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo Índice de Shannon.

Tabela 2. Média de diversidade da macrofauna (nº de grupos/ordem taxonômica) em três fragmentos de floresta, em agosto e dezembro de 2005, Londrina, PR.

Profundidade	Média de diversidade					
	Agosto/2005			Dezembro/2005		
	MG	AT	UEL	MG	AT	UEL
0-10 cm*	10,65	10,55	10,95	10,75	7,85	6,8
10-20 cm**	4,8	6,2	6,4	5,4	3,8	3,0
20-30 cm**	5,4	3,8	5,6	2,6	2,0	2,8

* Média de 25 repetições

** Média de 5 repetições

mais de 52% do total de indivíduos. Na época úmida, o fragmento de AT também teve a maior densidade, devido às minhocas, que representaram mais de 55% dos macroinvertebrados encontrados. Com exceção do fragmento UEL, Coleoptera e Oligochaeta tiveram maior abundância na época de chuva e todos os demais grupos tiveram maior abundância na época seca (Tabela 1).

O grupo Chilopoda e Aracnida (Pseudoescorpionidae e Aranae), importantes predadores no solo e serapilheira, tiveram maior densidade em MG, seguidos por AT e UEL (Tabela 1). Portanto, os fragmentos melhor conservados apresentam maior número de artrópodes predadores.

Conclusão

A diversidade de minhocas e total de macroinvertebrados do solo são bons indicadores de interferência antrópica. No presente estudo, MG foi confirmado como o fragmento mais conservado, podendo ser usado como referência de ambiente nativo, em estudos sobre impacto ambiental de transformação de ecossistemas naturais em outros tipos de uso do solo (por exemplo, sistemas agropecuários).

Agradecimentos

A equipe técnica da Entomologia, (Embrapa Soja), e à família Vicentini.

Referências

- ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. 1993. **Tropical soil biological and fertility: a handbook of methods**. 2. ed. Wallingford: CAB. International, 1993, 171 p.
- LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; WOLTERS, V.; ROGER, P.; INESON, P.; HEAL, O. W.; DHILLION, S. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal Soil Biology**. v. 33, p. 159-193, 1997.
- MEDRI, I. M.; LOPES, J. Scarabaeidae (Coleoptera) do Parque Estadual Mata dos Godoy e Área de Pastagem, no norte do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 18, n. (Supl.1), p. 135-141, 2001.
- MENDONÇA, F. A. A tipologia climática: Gênese, características e tendências, In: STIPP, N. M. F. (ed.), **Macrozoneamento ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi (PR)**. Editora UEL, Londrina, 2000, p. 21-62.
- PAOLETTI, M.G. **Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes: potential use of invertebrates to assess sustainable land use**. Amsterdam: Elsevier, 1999, 446 p.
- SWIFT, M.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Oxford: Blackwell, 1979, 372 p.
- VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da Biodiversidade em Fragmentos Florestais. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 25-42, dez, 1998.

Caracterização física preliminar da bacia hidrográfica dos Ribeirões dos Cágados e das Abóboras

Mariana Rossi Cardoso¹; Ivan Rodrigues de Almeida². ¹Estudante de Geografia e bolsista da Embrapa; ²Embrapa Soja.

Introdução

Este trabalho apresenta a fase preliminar da caracterização física da bacia hidrográfica dos Ribeirões dos Cágados e das Abóboras, cujo objetivo é organizar uma base de dados gerada a partir de técnicas de geoprocessamento. Nesta fase, os dados físicos da bacia hidrográfica, como a drenagem, os limites e a hipsometria, foram convertidos do meio analógico para o digital.

Portanto, a comunicação atende aos primeiros resultados da etapa de organização dos dados físicos da bacia hidrográfica dos Ribeirões dos Cágados e das Abóboras em ambiente computacional, utilizando Sistemas de Informação Geográfica – SIG, em desenvolvimento no Laboratório de Agrometeorologia da Embrapa Soja.

Localização

As nascentes dos Ribeirões dos Cágados e das Abóboras estão localizadas na área da Embrapa Soja, no Distrito de Warta. Seus cursos seguem rumo leste e, como rios de segunda ordem, são afluentes diretos do Rio Tibagi.

A principal característica de uso do Ribeirão dos Cágados na Embrapa Soja é abastecer a represa que serve de fonte de água para irrigação do campo experimental. Para ambos os ribeirões, destaca-se o esforço de adequação ambiental, visando manter Áreas de Preservação Permanente e Reserva Legal.

As coordenadas de abrangência da bacia compreendem as longitudes de $51^{\circ}14'$ e $50^{\circ}56'$ oeste, e as latitudes de $23^{\circ}03'$ e $23^{\circ}14'$ sul, situando-se entre os municípios de Londrina, Sertãoópolis e Ibiporã (Figura 1).



Figura 1. Localização da bacia dos Ribeirões dos Cágados e das Abóboras.

Materiais e Métodos

Os dados das curvas de nível foram organizados a partir das cartas topográficas, em escala de 1:50.000. Foram utilizadas as folhas de Sertãoópolis (SF-22-Y-D-III-2) e de Uraí (SF-22-Z-C-I-1) ambas elaboradas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.

Para a conversão das feições temáticas dos mapas analógicos, foram utilizados uma mesa digitalizadora e o software de geoprocessamento SPRING 4.1, disponível na página eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE.

As cartas topográficas foram ajustadas na mesa digitalizadora, de modo a compor a visão total da bacia e os seus limites. Em seguida, foi criado um banco de dados denominado como RIBCAB, contendo todos os parâmetros geodésicos das cartas topográficas originais, como o sistema de projeção cartográfica, as coordenadas do retângulo envolvente do projeto, o modelo elipsóide da Terra, entre outros. Também foram criados planos de informação (PIs) para representar, de modo individualizado, cada uma das feições das cartas topográficas, como as curvas de nível, o limite da bacia e a hidrografia.

Por intermédio da interpretação dos interflúvios e dos leitos fluviais, delimitaram-se os divisores das bacias, traçando uma nova linha sobre as cartas. A digitalização dessa nova feição e das demais constantes nos mapas (hidrografia e curvas de nível) consistiu basicamente em traçar um novo desenho para o meio digital, porém, constantemente assegurando para a minimização de erros que são inerentes num processo de conversão de dados e fundamentais para aproximação da exatidão sobre qualquer cálculo ou análise de dados espaciais.

Assim, a primeira etapa de organização dos dados físicos da bacia hidrográfica dos Ribeirões dos Cágados e das Abóbora foi concluída, sendo possível a organização e a elaboração de outras cartas temáticas digitais derivadas dessa base, como exemplo a carta de declividade, que apresenta o grau de inclinação de relevo e pode servir como um dos indicadores da aptidão agrícola da terra.

Resultados e Discussão

Depois de digitalizados, os dados físicos da bacia hidrográfica dos Ribeirões dos Cágados e das Abóbora, outros dados complementares puderam ser obtidos por meio de consultas ao SIG.

A bacia que compreende os dois ribeirões possui uma área total de 19.294

ha e perímetro de 83,6 km. O curso do Ribeirão dos Cágados apresenta a extensão de 31 km e o do Ribeirão das Abóboras com 29,5 km.

Totalizada a extensão dos demais afluentes inscritos nas duas bacias, obteve-se a soma de 254 km de rede hidrográfica. Com esses dados preliminares e sem considerar a natureza do leito fluvial, pode-se inferir que o mínimo necessário para atender à legislação que trata da Área de Preservação Permanente e recomposição da mata ciliar ocuparia aproximadamente 8% da área total.

Referências

CAMARA, G.; SOUZA, R. C. M.; FREITAS, U. M.; GARRIDO, J. SPRING: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modeling. **Computers & Graphics**, v. 20, n. 3, p. 395-403, 1996.

Análise estrutural do plasmídio simbiótico de *Rhizobium tropici* CFN299

Daisy Rickli Binde¹; Mariangela Hungria²; Lígia Maria de Oliveira Chueire²; Ismael Hernandez Lucas³; Marisa Fabiana Nicolás⁴; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos⁴; Luiz de Paula Gonzaga⁴; Esperanza Martinez-Romero³; Fernando Gomes Barcellos⁵; Miriam Francisca da Silva⁶. ¹Bolsista de Especialização da Embrapa Soja; ²Embrapa Soja; ³Centro de Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, México; ⁴Laboratório Nacional de Computação Científica; ⁵Bolsista ProDoc CAPES; ⁶Bolsista de AT do CNPq.

Introdução

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é usado em larga escala na América Latina, pelo seu baixo custo e alto valor nutricional, sendo a fonte mais importante de proteína para a população. Hoje, o Brasil é o segundo maior produtor do mundo dessa leguminosa. A cultura ocupou 4,8 milhões de hectares em 2001/2002, mas o país apresenta um dos níveis mais baixos de produtividade, sendo de apenas 834 kg/ha (Hungria et al., 2003).

Para obtenção de altas produtividades, é indispensável a reposição de nutrientes essenciais à planta e o emprego de tecnologia na cultura. O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento das plantas e a sua reposição é fundamental. Uma alternativa é o uso de fertilizantes nitrogenados que contudo, apresentam alto custo e sobre tudo, poluem significativamente as águas, alterando seu equilíbrio. Em contrapartida, a inoculação com bactérias do gênero *Rhizobium*, apresenta baixo custo e não possui caráter poluente. Além disso, o uso de inoculantes evita a queda da produtividade, preservando assim a fertilidade do solo (Hungria et al., 2003).

Para o aumento da produtividade é necessária a busca por estirpes cada vez mais eficientes e competitivas com relação às características de eficiência e competitividade na fixação biológica do nitrogênio (FBN). A prospecção de genes (por meio do sequenciamento genômico) relacionados a características de eficiência e competitividade na FBN em estirpes superiores de

rizóbios (como as utilizadas atualmente nos inoculantes comerciais) tem sido uma estratégia para o entendimento dos fatores relacionados à FBN e para o desenvolvimento de metodologias para a seleção e obtenção de estirpes de rizóbios cada vez mais promissoras.

Objetivo

Realizar o seqüenciamento do plasmídeo simbiótico (pSym) da estirpe CFN 299 de *Rhizobium tropici*, procurando genes relacionados à competitividade e eficiência no processo de fixação biológica do nitrogênio.

Material e Métodos

Construção de bibliotecas genômicas do pSym da estirpe CFN 299 de *R. tropici*

Extração de DNA genômico

O DNA dos pSym da estirpe CFN299 foi fornecido pelo Centro de Fijación de Nitrógeno – Universidade Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

Construção de bibliotecas

O preparo da biblioteca "shotgun" envolveu a purificação do DNA e a fragmentação aleatória do mesmo, por meio mecânico (nebulização), gerando fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 2 kb. Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas pelo uso do fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli* e fosforilados com uso da enzima PNK (polinucleotídeo quinase). Os fragmentos de 500 pb a 2 kb foram separados em gel de agarose "low melting" 1%, grau analítico (Invitrogen). Após recuperação, os mesmos foram ligados ao vetor pUC18 (digerido com a enzima de restrição SmaI e desfosfatado com a enzima BAP) (GE Healthcare) com o uso da enzima T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe TOP10 (Invitrogen), pela metodologia de eletroporação. As células foram inoculadas em meio LB (sem antibiótico) por mais ou menos 1 hora e em seguida semeadas em

meio LA contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma) e 50 mg.mL^{-1} de X-Gal e $0,1\text{M}$ de IPTG, e cultivadas durante a noite a 37°C .

Seqüenciamento

Colônias brancas individuais (clones recombinantes) foram inoculadas em meio "Terrific Growth" (Sigma) e ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), cultivadas a 37°C , 150rpm , por uma noite. Após o cultivo, foram obtidos "pellets" por centrifugação a 4.000 rpm , por 8 minutos.

O DNA foi extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook, 1987). O DNA purificado foi seqüenciado utilizando o "kit" "DYEnamicTM ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACETM)" (GE Healthcare). Foram realizadas duas reações de seqüenciamento, uma com o primer "Universal" ($5'\text{GACGTTGT AAAACGACGGCCAGT3'}$) e a outra com o "Reverso" ($5'\text{TTTCACACAGGAAA CAGCTATGAC3'}$), para a obtenção das seqüências dos fragmentos. Os produtos das reações foram analisados em seqüenciador automático (MegaBace1000, GE Healthcare).

Montagem do genoma e Análise da ORFs obtidas

As leituras obtidas foram submetidas à análise de bioinformática, realizada no LNCC com o programa SABIÁ, que integra vários programas de domínio público: "phred", "phrap", "Consed", "phrapview" e permite a identificação de "CDSs" (coding sequencer) como os programas "Glimmer", BLAST, KEGG, COG, INTERPRO e PSORT.

Resultados e Discussão

O seqüenciamento do pSym já permitiu a cobertura do genoma em 12 vezes, faltando apenas alguns intervalos entre os CDSs para completar o plasmídeo. Os resultados obtidos estão apresentados nos quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1. Número de leituras

Número total de leitura	8.769
Número de leituras sem vetor ($\geq 10\%$ vetor)	6.931
Número de leituras com 10-80% de vetor	1.434
Número de leituras com mais de 80% de vetor	404

Quadro 2. Número de bases

Número de bases depositadas (pb) - excluindo vetores e bases de baixa qualidade	8.360.378 (100%) (12,29 vezes o tamanho estimado do genoma)
Número de bases com qualidade ≥ 20 (bp)	4.492.065 (47,12%)
Número de bases com qualidade ≥ 30 (bp)	3.499.634 (36,71%)

Quadro 3. Cobertura do genoma

Comprimento estimado do genoma (pb)	680.000
Cobertura do Genoma	762.909 (112,19% do comprimento estimado)
Cobertura do Genoma usando contigs > 3Kb	417,266 (61,36 % do comprimento estimado)

Referências

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 88-93, 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K., Ed. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005.
- SAMBROOK, J. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2.ed. Fritsch: T. Maniatis, 1987.

Diversidade genética baseada no PCR-RFLP dos genes *16S-rRNA* E *recA* de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos virgens dos Cerrados

Fábio Plotegher¹; Iêda Carvalho Mendes²; Mariangela Hungria³. ¹Bolsista de IC do CNPq; ²Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; ³Embrapa Soja.

Introdução

Atualmente, o feijão (*Phaseolus vulgaris*), faz parte da base de alimentação de cerca de 300 milhões de pessoas, especialmente na América Latina, no sul e leste da África. O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor mundial de feijão, contudo, os rendimentos médios nacionais são bastante baixos, de apenas 789 kg/ha, na safra 2005/2006. O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos pouco férteis, especialmente pobres em nitrogênio (N_2), contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N_2 pela simbiose com bactérias diazotróficas representaria uma alternativa para incrementar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de contribuir para uma menor emissão de gases causadores do efeito estufa. Para o estabelecimento de uma simbiose efetiva, é necessário, porém, maior conhecimento da diversidade dos rizóbios nativos de cada local.

A região dos Cerrados é, hoje, responsável pela maior produção de grãos no Brasil. Alguns estudos sobre a diversidade genética de rizóbios microsimbiontes do feijoeiro, em áreas sob cultivo com essa leguminosa, foram conduzidos e indicam diversidade genética e simbiótica bastante elevada (Mostasso et al., 2002). Contudo, pouco se conhece sobre a diversidade de rizóbios em áreas virgens dos Cerrados, bem como sobre o impacto do estabelecimento da agricultura nessa população nativa. Como o feijoeiro

é considerado planta promíscua para nodulação, este trabalho tem por objetivo caracterizar geneticamente rizóbios capturados por essa leguminosa em áreas virgens dos Cerrados e compará-los com as populações de áreas sob cultivo.

Materiais e Métodos

Foram coletados nódulos das raízes de feijoeiro em diversas áreas dos Cerrados nunca cultivadas anteriormente. Procedeu-se ao isolamento das bactérias desses nódulos, sendo obtidos 186 isolados. A capacidade de nodulação e fixação biológica do N_2 desses isolados foi confirmada em experimento feito com vasos de Leonard em casa-de-vegetação.

O DNA das bactérias foi extraído, quantificado e amplificado pela técnica de PCR ("polymerase chain reaction") com o "primer" BOX-A1R, segundo Kaschuk et al. (2006). Como padrões em todas análises, foram utilizadas sete estirpes representativas das espécies de rizóbios que nodulam o feijoeiro. Considerando um nível de similaridade de 70%, foram obtidos 99 perfis distintos.

O DNA dessas 99 bactérias foi amplificado com "primers" (fD1' e rD1) que codificam a região do gene ribossomal 16S rRNA, segundo Germano et al. (2006). Os produtos dessas amplificações foram submetidos à metodologia de RFLP (restriction fragment length polymorphism) – PCR, com três enzimas de restrição, *Rsa* I, *Msp* II, *Hae* III.

A partir do novo dendrograma, foram selecionados 33 isolados. O DNA dessas bactérias foi amplificado com os "primers" para a região do gene *recA* descritos por Payne et al. (2005): Bur 1 (5'-GATCGA(AG)AAGCAGT CGGCAA – 3') e Bur 2 (5' – TTGTCCTTGCCTG(AG)CCGAT – 3') (Payne et al. 2005). A seguir, os isolados foram analisados por RFLP – PCR, com três enzimas de restrição: *Rsa* I, *Hinf* I e *Hae* III.

Em todas as análises, o polimorfismo foi avaliado, usando o software BIONumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA (unweighted pair – group with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

A análise das regiões repetitivas e conservadas do DNA, normalmente localizadas nos espaços intergênicos, pela amplificação com o “primer” BOX A1R – PCR detectou um nível de diversidade genética, pois praticamente cada estirpe apresentou um perfil único e, em um nível de similaridade de 70%, 99 perfis distintos foram obtidos (dados não mostrados). A análise de BOX – PCR detecta variabilidade entre estirpes e a diversidade genética elevada detectada neste estudo pode estar relacionada à adaptação às condições ambientais estressantes dos Cerrados, com temperaturas elevadas, longos períodos de estiagem, solos extremamente ácidos e pobres em nutrientes, entre outros.

Na análise por RFLP – PCR da região do gene ribossomal 16S, que indica variabilidade em nível de gênero/espécie, considerando o nível de similaridade de 70%, contabilizam-se sete espécies distintas. Houve predominância de uma espécie (Figura 1), bastante distinta das estirpes-tipo representativas das espécies de rizóbios que nodulam o feijoeiro. Mesmo em relação aos demais isolados dos Cerrados posicionados em outros agrupamentos, a similaridade genética com as estirpes-tipo foi baixa. Como o gene 16S rRNA tem sido considerado como referência para a taxonomia de bactérias (Garrity & Holt, 2001), esses resultados são um forte indicativo de novas espécies ainda não definidas de bactérias diazotróficas nos Cerrados. Outro gene que pode fornecer bastante informação sobre a posição taxonômica das bactérias é o *recA* (Payne et al., 2005). Na análise por RFLP – PCR dessa região gênica, também houve predomínio de uma espécie (Figura 2). Houve congruência elevada entre os genes 16S rRNA e *recA*. Na comparação com o banco de dados do Laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa Soja, que contém mais de 400 rizóbios microssimbiontes de feijoeiro provenientes de áreas cultivadas dos Cerrados, os isolados deste estudo mostraram perfis distintos de BOX – PCR e de RFLP – PCR do 16S rRNA e de *recA*, indicando expressiva alteração genética na população com a entrada da agricultura.

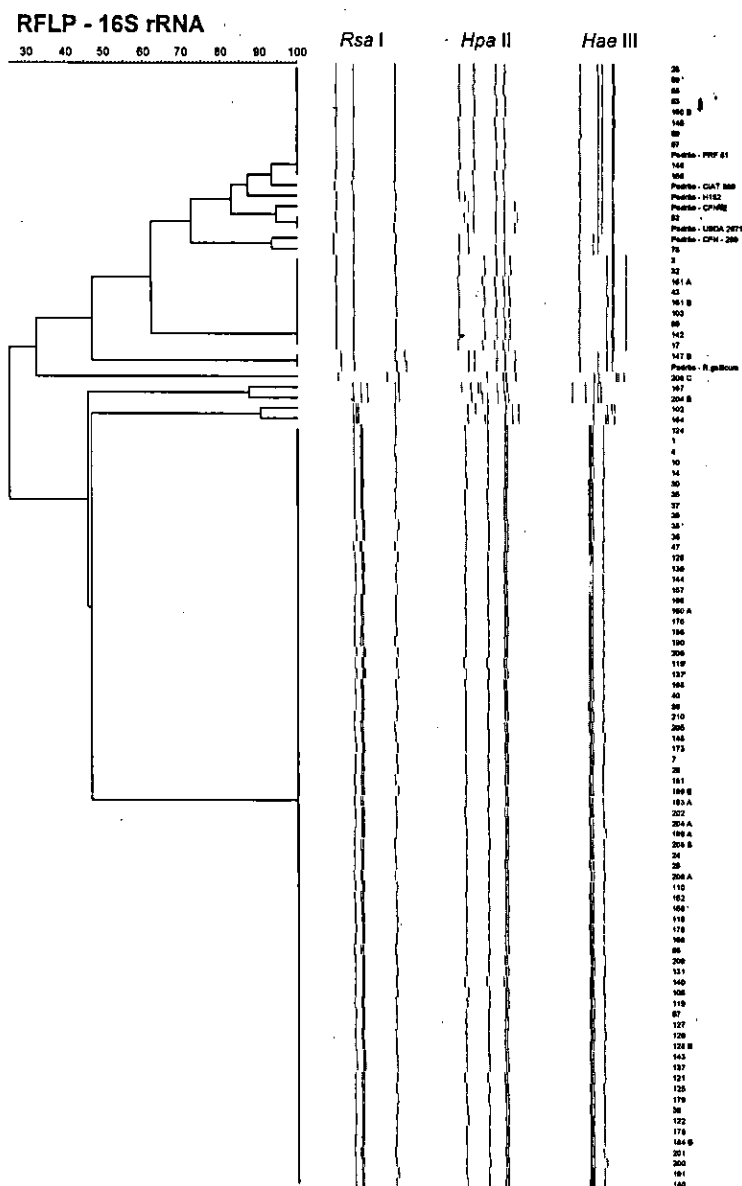


Figura 1. Agrupamento polifásico dos produtos de PCR-RFLP do gene 16S-rRNA com três enzimas de restrição dos rizóbios microssimbiontes do feijoeiro isolados de solos dos Cerrados.

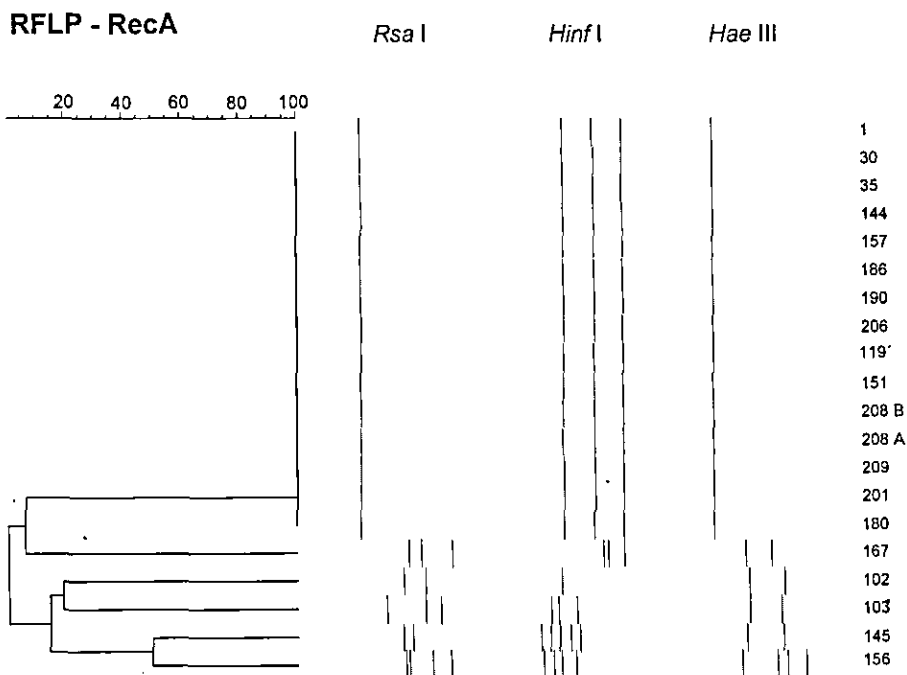


Figura 2. Agrupamento polifásico dos produtos de PCR-RFLP do gene *RecA* com três enzimas de restrição.

Considerações Finais

A diversidade genética elevada detectada neste estudo representa um forte indicativo de que muitas espécies de bactérias diazotróficas simbióticas nativas dos Cerrados ainda não foram descritas, ressaltando a necessidade de preservação de áreas ainda não cultivadas, pois essas bactérias podem representar uma fonte importante de genes para a agricultura e para o meio ambiente.

Referências

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map Manual. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of sys-**

tematic bacteriology, 2.ed. New York: The Williams & Wilkins: Springer - Verlag, 2001. v. 1, p. 119-154.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty – three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 210-220, 2006.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E.; Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire burkholderia genus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, No. 7, p. 3917-3927, 2005.

Criação e organização do banco de dados da coleção de culturas de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas da Embrapa Soja

Susan Higashi¹; Mariangela Hungria². ¹Bolsista de IC do CNPQ; ²Embrapa Soja.

Introdução

A preservação e a utilização dos recursos microbiológicos exigem a manutenção de coleções de culturas. Assim, as coleções de culturas microbianas surgiram devido a necessidade de armazenamento e organização dos recursos genéticos microbianos. Portanto, as coleções de cultura atuam como centros de conservação *ex-situ* de recursos genéticos microbianos, sendo essenciais na exploração da diversidade genética e metabólica microbiana como, por exemplo, nas atividades de bioprospecção. As coleções de cultura podem atuar como coleções de serviço, onde, além da preservação dos recursos microbiológicos, oferecem oportunidades de envio de material biológico para instituições de pesquisa, universidades, indústrias, entre outros; e de informações (taxonômicas, fisiológicas, de isolamento, entre outras) que facilitem a utilização dos recursos microbianos (Barata, 2006).

No entanto, para que as informações existentes nas coleções de cultura possam ser utilizadas, elas devem ser devidamente organizadas em banco de dados, necessitando, assim, registro e documentação (Heuser, 2004). Os bancos de dados de coleções de culturas devem conter informações do nome do organismo, do número da linhagem, do número em outras coleções, do histórico, do tipo de organismo, das restrições, das condições de crescimento, dos dados de isolamento (data, nome e localidade), dos dados taxonômicos (características morfológicas, fisiológicas), das referências bibliográficas, e do nome, endereço e assinatura do depositante (Sette, 2006).

O Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja está desenvolvendo, atualmente, um projeto para a implementação de uma coleção de culturas de bactérias de importância agroindustrial: diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas. Para a implementação, desta coleção, será necessária a criação de um banco de dados, que organizará as informações relativas às culturas bacterianas. Desta forma foram desenvolvidas atividades no sentido de implementar este banco de dados para a coleção de culturas da Embrapa Soja.

Objetivos

Implementação do banco de dados para a coleção de culturas de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas.

Materiais e Métodos

A metodologia adotada seguiu-se conforme os itens:

1. Fez-se um levantamento dos dados que seriam depositados no banco.
2. Estabeleceu-se a estrutura do banco de dados, criando as seguintes tabelas:
 - a. 29 tabelas entidade; e
 - b. 3 tabelas relacionamento.
3. Construiu-se o banco de dados usando o sistema de gerenciamento de banco de dados (SGDB) MySQL 5.0.16.

Resultados

Inicialmente, foi realizado um levantamento e um estudo das estruturas utilizadas atualmente nos bancos de dados de coleções de culturas, e a estrutura implementada pode ser visualizada na Figura 1.

A seguir, deu-se início à organização dos primeiros dados, para a construção prévia do banco de dados, o que é essencial para verificar se a estrutura

proposta é adequada. Desta forma, foram utilizados os dados referentes a 148 estirpes de bactérias diazotróficas simbióticas (rizóbios) existentes na coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja (Menna et al., 2006 e Germano et al., 2006).

Referências

- BARATA, G. **Patrimônio genético é estocado para aplicações futuras.** Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/genetico/gen04.shtml>. Acesso em: 22 maio. 2006, 14:07:28.
- GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.
- HEUSER, C. A. **Projeto de banco de dados.** 5ª Edição. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 2004. 254 p. v. 4. (Livros didáticos).
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.
- SETTE, L. D. **Recursos Humanos e Infra-Estrutura para Coleções Microbiológicas.** Disponível em: www.cria.org.br/cgee/documentos/infra-estrutura.doc. Acesso em: 20 jun. 2006, 14:04:30.

Sequenciamento genômico e bioprospecção de genes de *Rhizobium tropici* estirpe PRF 81 (SEMIA 4080) utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro

Fabiana Gisele da Silva Pinto^{1,2,3,4}; Lígia Maria de Oliveira Chueire^{1,5}; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos^{6,7}; Marisa Fabiana Nicolás⁶; Luiz Gonzaga⁸; Rangel Celso Souza⁶; Mariangela Hungria^{1,2,7}. ¹Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, fabigsp@cnpso.embrapa.br; ²Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia; ³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR; ⁴Bolsista de doutorado do CNPq; ⁵Bolsista de AT do CNPq; ⁶Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, RJ; ⁷Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq.

Introdução

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O rendimento médio nacional é bastante baixo, devido, a pouca tecnologia empregada na cultura e ao cultivo em solos pobres, especialmente em N. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N, pela simbiose com bactérias diazotróficas, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e diminuir a emissão de gases de efeito estufa. A eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio pela cultura do feijoeiro tem sido considerada baixa. Tal fato é atribuído a problemas relacionados à nodulação, pela dificuldade de introdução de melhores estirpes e baixa tolerância a estresses ambientais, como temperaturas elevadas e deficiência hídrica. Através de um programa de seleção de estirpes mais eficientes no processo de fixação de N₂ e com boa capacidade saprofítica e competitiva, foi identificada a estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*, recomendada desde 1998 para a produção de inoculantes comerciais destinados à cultura do feijoeiro (Hungria et al., 2000, 2003). Como o Brasil é, hoje, o país que mais utiliza inoculantes com rizóbios, torna-se importante desenvolver estudos de genéticos com estirpes brasileiras. A relevância desses estudos genéticos é ainda maior

no caso do microssimbionte do feijoeiro, cultura que necessita de impulso tecnológico para incrementar rendimentos a um baixo custo.

Viprey et al., 2000 propuseram uma estratégia de obtenção parcial do genoma, que pode ser denominada de “panorama genômico”, baseada no seqüenciamento de, aproximadamente, 10% a 15% do genoma. Esses autores conseguiram identificar, utilizando essa estratégia, muitos genes importantes da estirpe NGR234, atualmente classificada como *Sinorhizobium fredii*. Essa mesma técnica será utilizada para obter o panorama genômico da estirpe PRF 81 *R. tropici* com o objetivo de detectar genes relacionados as altas capacidades competitiva e saprofítica, e a eficiência de fixação N₂ dessa estirpe.

Material e Métodos

Extração do DNA genômico

As células da estirpe PRF 81 foram obtidas após crescimento em meio de cultura LB, centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e estocagem a -70°C. O DNA das bactérias foi extraído pelo método usual descrito por Sambrook et al. (1989) e utilizado para a construção das bibliotecas de “shotgun”.

Construção de bibliotecas “shotgun”

A purificação do DNA genômico foi realizada conforme descrito por Fleishmann et al. (1995) e a fragmentação do DNA ao acaso, por meio mecânico (nebulização). Após a fragmentação, as extremidades serão reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Fragmentos com tamanho entre 1,0 -3,0 kb foram separados em gel de agarose “low melting”. Após a recuperação destes fragmentos a partir do gel de agarose, foi realizada a ligação ao vetor pUC18, digerido com a enzima de restrição *Sma*I, e desfosforilados (BAP), e posterior ligação com T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe Top10, através da técnica de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio LB (Sambrook et al., 1989) contendo ampicilina (250 µg. mL⁻¹) e crescidas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes produzidos foram, então, transferidos para placas do tipo ELISA de 96 poços, contendo meio líquido “Terrif Broth, TB”

(Invitrogen™), suplementado com ampicilina (250 µg. mL⁻¹) e glicerol a 8% e armazenados a -70°C.

Seqüenciamento dos clones

As colônias individuais das bibliotecas obtidas foram inoculadas em meio "Terrific Grow" acrescido de ampicilina (250 µg. mL⁻¹) e foram crescidas com agitação de 300 rpm, por 16 horas, a 37°C. O DNA foi extraído pelo método usual de rompimento alcalino. O DNA purificado foi ressuspenso em água e verificado em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Para o seqüenciamento, utilizou-se o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR foram realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso" (Invitrogen), para se conseguir a amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes.

Montagem e bioprospecção automática de genes

As seqüências obtidas foram submetidas e armazenadas no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). As "ORFs" ("open reading frames"), ou "CDSs" (coding DNA sequences) foram submetidas a uma análise por ferramentas de bioinformática e integradas a um "software" **SABIÁ: System of Automated Bacterial Integrated Annotation**, que integra a montagem e a anotação de genomas (Almeida et al., 2004a,b).

Resultados

O seqüenciamento dos clones resultou no depósito de 10.046.403 pares de bases (pb), que corresponderiam a 1,44 vezes o genoma, com 43,45% das bases com qualidade ≥ 20 , 34,84% de bases com qualidade ≥ 30 e somente 3,57% de bases com vetores (dados não apresentados). Inicialmente foi previsto o seqüenciamento de 10% a 15% do genoma da estirpe PRF 81, estimado em sete milhões de pb, mas a cobertura real obtida correspondeu ao dobro do previsto (Tabela 1).

O projeto previa a identificação de um terço dos genes, estimados em 1.500, mas foram identificadas 2.161 CDSs, das quais, 1208 foram validadas, 691

Tabela 1. Panorama genômico da estirpe de PRF 81 de *Rhizobium tropici*.

Parâmetro	Situação
Número total de leituras	9.026
Número total de leituras sem vetores (<=10% vetor)	8.431
Nº de bases depositadas (bp) excluindo vetor, incluindo bases de baixa qualidade	10.046.403 (100%) Cobertura = 1,44 vezes
Número de bases com qualidade >=20 (bp)	4.526.803 (43,45%)
Número de bases com qualidade >=30 (bp)	3.629.712 (34,84%)
Número total de "contigs"	2.789
Tamanho médio dos "contigs"	1.303.99
Cobertura por "contigs" phrap (pb)	2.097.134
Número médio de leituras em um "contig"	3,24
Qualidade média das bases nos "contigs" phrap	23,04
Cobertura do genoma (estimado em 7.000.000 pb), considerando-se a soma dos "contigs" (pb)	2.175.048
Cobertura do genoma	31,07%

foram classificadas como hipotéticas conservadas e 262 como hipotéticas. Foram identificados genes putativos, em todas as classes funcionais. O maior número de CDSs validados foi relacionado ao metabolismo de aminoácidos, de carboidratos e do metabolismo secundário. Contudo, 60,4% das CDSs não puderam ser classificadas em categorias KEGG (Figura 1). Também foram identificados genes de nodulação (*nodA*, *nodC*, *nodI*, *nodQ*, *nodS*, *nodT*, *nodU*, *nolG*) e fixação do N₂ (*nifA*, *nifN*, *nifR*, *nifS*, *nifX*, *nifW*, *fixA*, *fixB*, *fixC*, *fixL*).

Obteve-se um elevado número de CDSs relacionadas à biodegradação e xenobióticos, particularmente do benzoato, bem como a presença de CDs relacionadas a quimiotaxia e síntese de flagelos. Essas CDs devem estar relacionadas à adaptabilidade e à capacidade competitiva elevada da estirpe PRF 81. É importante destacar, também, a presença de quatro proteínas de secreção do tipo II (três relacionadas a "pili" e uma a "fimbrae"), seis do tipo III (biossíntese de flagelos) e quatro do tipo IV (proteínas de

Classificação Categorias KEGG

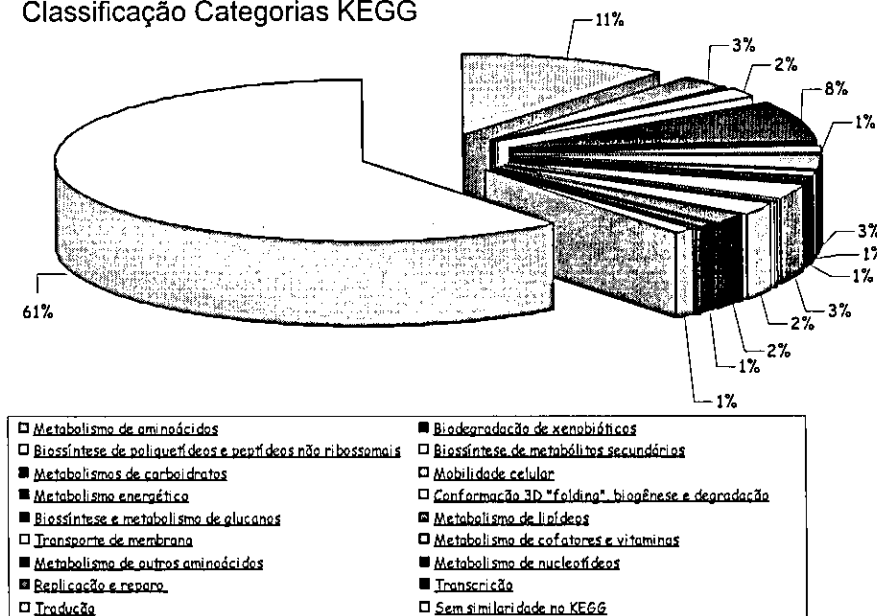


Figura 1. Distribuição percentual das CDSs de *R. tropici* PRF 81, segundo a base de dados KEGG.

transferência de conjugação *traG*—similaridade elevada com *Sinorhizobium meliloti* e *R. etli*; *trb1* — similaridade com NGR 234 e *R. etli*; *trbD*, maior similaridade com *R. etli* e *virB6*, presente em *R. etli* e *S. meliloti*). Essas proteínas de secreção indicam similaridade elevada entre os mecanismos de infecção para a formação de nódulos e patogenicidade.

Conclusões

A estratégia de obtenção parcial de um genoma mostrou-se viável, permitindo a identificação de genes importantes na estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080), de *Rhizobium tropici*, economicamente importante, pois é recomendada para o uso em inoculantes comerciais na a cultura do feijoeiro.

Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente com recursos do CNPq.

Referências

- ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A new set of bioinformatics tools for genome projects. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 26-52, 2004a.
- ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; BARRIENTOS, J. A.; SANTOS, M. T.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A system for automated bacterial (genome) integrated annotation – SABIA. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2832-2833, 2004b.
- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMP, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, Washington, v. 269, p. 496-512, 1995.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTIERREZ-MANERO, J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia strains. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 1, p. 88-93, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. K.; PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v. 1, p. 1-17, 2000.

Caracterização morfológica de isolados de rizóbio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), no Estado de Santa Catarina

Priscila Stocco¹; Julio C. P. Santos²; Vitor P. Vargas³; Diego Pasqualini¹; Mariangela Hungria⁴. ¹Mestrando em Ciência do Solo, CAV-UDESC-Centro de Ciências Agroveterinárias - Universidade do Estado de Santa Catarina; ²Professor Depto de Solos, CAV-UDESC; ³Acadêmico do Curso de Agronomia CAV-UDESC; ⁴Pesquisadora Embrapa Soja.

Introdução

No Brasil, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa lugar de destaque na agricultura, destacando-se como um produto de mercado interno, cujos grãos representam uma fonte importante de proteínas e de minerais para a população.

O feijoeiro, a exemplo de outras leguminosas, apresenta a capacidade de associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio da ordem *Rhizobiales*. Uma das principais características da simbiose no feijoeiro é a elevada promiscuidade da planta hospedeira com diversos microssimbiontes. A caracterização das propriedades morfológicas das bactérias representa um primeiro passo para o levantamento da biodiversidade, fundamental para o conhecimento das comunidades nativas de rizóbios.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização morfológica de isolados de rizóbios, obtidos a partir de nódulos de feijoeiro coletados em diversos locais do Estado de Santa Catarina.

Material e Métodos

Foram coletados nódulos de raízes de feijoeiros, a partir de plantas, colhidas ao acaso, e amostras de solo, em 34 áreas do extremo/meio oeste e do planalto sul catarinense.

No laboratório, dez nódulos foram retirados ao acaso, procedendo-se o isolamento e obtenção de culturas puras de bactérias, de acordo com metodologia descrita por Vicent (1970). Para isso, os nódulos foram desinfestados superficialmente durante 1 minuto em álcool (95%), 5 minutos em hipoclorito de sódio comercial e lavados em água destilada/esterilizada por cinco vezes; em seguida, foram macerados com uma pinça flambada e, com uma alça de platina, repicados em meio de cultura YM contendo o corante vermelho congo. Todas as estirpes foram caracterizadas quanto à produção de muco, transparência, cor, tamanho, borda, elevação e crescimento, aos três e sete dias de crescimento. Também foi observada, a partir do quinto dia de crescimento, a acidificação ou alcalinização do meio YM contendo o indicador de pH azul de bromotimol.

O solo foi classificado conforme o mapa de classificação dos solos de Santa Catarina (Embrapa, 2006) e as análises químicas determinadas segundo os métodos propostos por Tedesco et al. (1995). A caracterização química dos solos pode ser visualizada na Tabela 1.

Resultados e Discussão

Foram obtidos 117 isolados em cultura pura com características típicas de rizóbios. Foi constatado grande variabilidade morfológica em diversos caracteres, com ênfase para a produção de muco. Os isolados apresentaram crescimento rápido, sendo possível realizar a caracterização em apenas três dias. Os grupos predominantes foram aqueles que apresentaram colônias de cor branca opaca em YMA e produção moderada de muco. Aproximadamente 97% dos isolados apresentaram reação ácida em meio YMA contendo azul de bromotimol; quanto a coloração 89% dos isolados apresentaram colônia branca opaca, 8,5% translúcida e 2,5% rosa (Tabela 2).

Estes isolados estão sendo analisados, atualmente, com o uso de marcadores moleculares, como o BOX A1R – PCR e o RFLP – PCR do gene ribossomal 16S, o que possibilitará a realização de estudos de diversidade e taxonomia.

Tabela 1. Procedência, classificação e propriedades químicas de amostras de solos coletados no estado de Santa Catarina, de onde foram obtidos os rizóbios microssimbiontes de feijoeiro.

Localização	Classificação do solo	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	Ca*	Mg*	Al*	Na**	K**	P**	N***	% MO
1. Guatambu	Latossolo vermelho distrófico	7,02	6,47	14,34	2,81	0,30	18,0	244,0	288,53	0,0776	3,51
2. Caxambu do Sul	Nitossolo vermelho eutrófico	5,03	4,36	5,28	0,53	0,50	12,0	335,5	69,86	0,1024	3,48
3. Palmitos	Nitossolo vermelho eutrófico	6,53	5,65	15,30	5,57	0,10	21,5	878,5	1152,52	0,1440	5,50
4. Planaltina	Nitossolo vermelho eutrófico	5,29	4,64	10,80	3,05	0,40	18,0	180,0	20,16	0,1652	4,40
5. Pinhalzinho	Latossolo vermelho distrófico	5,25	4,56	6,00	1,78	0,20	16,0	392,5	33,55	0,1020	3,22
6. Peritiba	Nitossolo vermelho eutrófico	5,59	4,70	12,24	2,61	0,35	11,5	603,0	82,86	0,1602	3,36
7. Ouro	Nitossolo vermelho eutrófico	5,89	5,87	8,10	3,26	0,20	24,5	345,5	82,29	0,1228	3,16
8. Campos Novos	Latossolo vermelho distrófico	5,83	5,10	9,66	5,04	0,25	15,0	415,5	105,65	0,1544	4,62
9. Brunópolis	Latossolo Bruno distrófico	4,41	3,79	3,48	0,89	2,73	9,0	182,0	29,46	0,1146	3,32
10. BR 470 km 261	Latossolo Bruno distrófico	5,49	4,56	3,90	1,07	0,45	4,5	42,0	87,56	0,0812	2,83
11. Estação de Aquicultura - Lages	Cambissolo húmico textura média	6,52	5,88	9,54	3,38	0,20	6,0	44,5	656,24	0,1142	7,11
12. Pánel	Latossolo Bruno distrófico	4,35	3,91	2,64	0,15	1,93	13,0	150,0	88,96	0,1390	9,10
13. Cedro - Urupema	Latossolo Bruno distrófico	5,42	4,98	8,88	4,18	0,40	12,0	220,5	108,16	0,2789	11,03
14. Urupema	Latossolo Bruno distrófico	5,56	4,76	14,40	3,59	0,30	26,0	93,5	127,41	0,2022	7,54
15. São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	5,98	5,51	6,48	3,85	0,15	11,0	121,0	24,24	0,2500	8,72
16. Sto Ant. Pinhos - São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	6,06	5,21	12,06	4,74	0,30	17,0	505,5	217,89	0,1453	7,49
17. Toca da Onça - São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	5,94	5,27	10,80	3,38	0,30	21,5	927,5	332,69	0,2121	5,47
18. Guaiabaira - São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	5,14	4,57	7,38	3,35	0,40	15,0	451,0	25,82	0,2076	5,65
19. Salto Rio Caveiras - Lages	Latossolo Bruno distrófico	5,17	4,50	5,10	2,61	0,45	15,5	310,5	35,56	0,1968	5,39
20. Urupema - 1600 m altitude	Cambissolo húmico aluminico	5,25	4,53	8,16	3,73	0,99	24,0	290,5	837,46	0,4603	6,51
21. Cadeados - Lages	Cambissolo húmico aluminico	5,40	3,79	4,20	1,16	5,11	11,5	294,5	131,19	0,1968	5,31
22. Bela Vista - Lages	Cambissolo húmico aluminico	6,17	5,44	11,82	6,46	0,20	35,5	162,0	59,78	0,2293	5,87
23. Cerro Alto - Palmeira	Cambissolo húmico aluminico	5,15	4,54	5,16	4,50	0,35	18,0	286,5	439,74	0,2220	5,05

*Teores de Ca, Mg e Al no solo (cmolc dm⁻³); **Teores de Na, K e P no solo (mg dm⁻³); ***Teor de N no solo (mg)

Tabela 2. Morfologia das colônias e reação de acidificação/alcalinização em meio YMA de rizóbios de feijoeiro do estado de Santa Catarina. Caracterização realizada aos três dias de crescimento.

Cor	Transparência	Produção de muco	Reação em meio YMA	Número de isolados
Branca	Opaca	Abundante	Ácida	7
		Moderada	Ácida	79
			Básica	2
		Pouca	Ácida	14
			Básica	1
			Neutra	1
	Translúcida	Abundante	Ácida	1
		Moderada	Ácida	9
Rosa	Opaca	Pouca	Ácida	3
Total				117

Referências

EMBRAPA. **Mapa de Solos do Estado de Santa Catarina**. Disponível em: <http://mapserver.cnps.embrapa.br/website/pub/Santa_Catarina/viewer.htm>. Acesso em 25 de abril 2006.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. A.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.

VICENT, J. M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (IBP Handbook, nº 15)

Diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes leguminosas, com base na análise do gene ribossomal 16S e dos genes de nodulação *nodY/KA*

Pâmela Menna¹; Jesiane Stefania da Silva Batista²; Fernando Gomes Barcellos³; Eliane Bangel⁴; Mariangela Hungria⁵. ¹Aluna de Doutorado Universidade Estadual de Londrina - Bolsista DTI CNPq; ²Aluna de Doutorado UEL - Bolsista CAPES; ³Bolsista pro-doc CNPq; ⁴FEPAGRO; ⁵Embrapa Soja.

Introdução

O gênero *Bradyrhizobium* inclui bactérias que formam simbioses específicas com determinadas leguminosas, tais como soja (*Glycine max*), feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), amendoim (*Arachis hypogaea*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*), *Crotalaria juncea*, *Acácia* sp., *Lupinus* sp., siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e com a não leguminosa *Parasponia* sp. (You et al., 2002). Atualmente, existe um grande conhecimento sobre a genética das espécies *B. japonicum* (Fischer, 1994) e *B. elkanii* (Dobert et al., 1994) simbiotes de soja, no entanto, relativamente muito pouco se conhece sobre a genética das demais espécies, bem como as que nodulam distintas leguminosas.

Como em muitas outras bactérias, a análise da diversidade e taxonomia do gênero *Bradyrhizobium* tem sido derivada, principalmente, da análise das seqüências nucleotídicas do gene ribossomal 16S (16S RNAr). O uso desse gene se deve à constatação de que ele é suficientemente conservado, o que permite o estabelecimento de relações evolucionárias universais, mas com variabilidade suficiente para permitir a classificação taxonômica (Menna et al., 2006).

A análise dos genes de nodulação, tais como os genes *nodABC*, também tem sido utilizada para determinar a diversidade genética e verificar possíveis eventos de transferência lateral de genes entre bactérias capazes de estabelecer simbiose, sendo que sua análise tem demonstrado um elevado grau de similaridade genética entre estirpes simbiotes de uma mesma

planta hospedeira (Hungria & Stacey, 1997). Ao contrário de *Rhizobium*, em *B. japonicum*, um gene adicional, *nodY*, precede o operon *nodABC*. Este mesmo gene tem sido identificado em *B. elkanii* e, devido a sua baixa homologia ao gene *nodY* de *B. japonicum*, tem sido denominado *nodK* (Doberet et al., 1994). Estudos têm demonstrado que os genes *nodY* ou *nodK*, podem estar relacionados à especificidade a *Glycine max* em espécies de *Bradyrhizobium* (You et al., 2002).

No Brasil, diferentes instituições de pesquisa são depositárias de coleções de culturas de rizóbios, provenientes de distintas leguminosas, sendo que a "Coleção de Culturas SEMIA" do Centro de Pesquisa de Fixação Biológica do Nitrogênio, da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO), é a responsável pela manutenção e distribuição dessas estirpes. Embora essa coleção seja um reservatório de estirpes de rizóbios, resultantes de programas de seleção durante décadas, muito pouco se conhece sobre a diversidade e as relações genéticas existentes entre as mesmas e suas respectivas plantas hospedeiras, em regiões tropicais. Dessa Coleção, 68 estirpes foram previamente analisadas por Menna et al. (2006) e os resultados, com base no sequenciamento do gene 16S RNAr, indicaram uma diversidade genética elevada, com indicativos de possíveis novas espécies.

O estudo dos genes de nodulação e fixação, assim como de outros genes relacionados à simbiose, podem levar à identificação de novas espécies, bem como à determinação de como esses genes são e estão sendo difundidos na natureza, estabelecendo assim, bases moleculares para o conhecimento sobre os processos evolutivos que levam à elevada diversidade nos trópicos. Desse modo, o estudo de coleções permitirá identificar genes determinantes da especificidade hospedeira e da eficiência no processo de fixação biológica do nitrogênio, bem como o desenvolvimento de marcadores moleculares para o uso em programas de seleção de estirpes.

Objetivo

Caracterizar a diversidade genética de 76 estirpes de *Bradyrhizobium*, através da análise do gene ribossomal 16S e dos genes de nodulação *nodYA* ou *nodKA*.

Desenvolvimento

Estirpes utilizadas

Foram analisadas 76 estirpes, provenientes da FEPAGRO, denominadas SEMIA (Secção de Microbiologia Agrícola), isoladas de 24 distintas leguminosas. Trinta dessas estirpes foram previamente classificadas com base nas seqüências do 16S RNAr, como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Menna et al., 2006).

Extração do DNA e amplificação por PCR da região do DNA, que codifica para o gene 16S RNAr e *nodYA* ou *nodKA*

A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Menna et al. (2006). O gene ribossomal 16S RNAr foi obtido de 46 estirpes, utilizando os "primers" fD1 e rD1 conforme descrito por Weisburg et al. (1991), já os genes *nodYA* ou *nodKA* foram amplificados de todas as estirpes, utilizando os "primers" nodKup e nodAp4, conforme descrito por Sterner e Parker (1999). Posteriormente os produtos de PCR obtidos foram precipitados, utilizando o protocolo descrito por Menna et al. (2006). Após a precipitação, a concentração do DNA de cada amostra foi verificada em gel de agarose a 1.5%, ajustada para 40 ng DNA μL^{-1} e mantida a -20°C .

Seqüenciamento e análise dos gene 16S rRNA e *nodYA* ou *nodKA*

Os produtos de PCR obtidos de cada estirpe (80 ng por reação) foram seqüenciados conforme descrito por Menna et al. (2006), sendo que para os genes *nodYA* ou *nodKA* foram utilizados os mesmos "primers" descritos para a amplificação. As seqüências obtidas foram reunidas em "contigs" utilizando os programas phred e phrap. Posteriormente, uma árvore filogenética foi construída com o coeficiente de Neighbour Joining e análise de "bootstrap" com 2.000 repetições.

Resultados e Discussão

Análise filogenética das seqüências do gene ribossomal 16S RNAr

A árvore filogenética resultante, após a análise das seqüências do 16S RNAr, dividiu as estirpes em dois grupos principais. Esses grupos foram relacionados aos gêneros/espécies de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*.

Assim como reportado por Menna et al. (2006), foi possível observar alguns agrupamentos distintos, com estirpes apresentando discrepância de até 1% nas seqüências nucleotídicas em relação às estirpes-tipo, sugerindo que essas podem estar relacionadas a novas espécies e, desse modo, foram classificadas como "sp."

Os resultados demonstraram, também, uma elevada promiscuidade quanto à planta hospedeira, com estirpes estabelecendo simbiose com leguminosas pertencentes a distintas tribos e até mesmo a distintas subfamílias, mas não foi possível observar uma correlação evolucionária entre as estirpes e suas respectivas plantas hospedeiras.

Análise filogenética dos genes *nodYA* ou *nodKA*

A presença dos genes *nodY* ou *nodK*, precedendo o operon *nodABC*, é exclusiva do gênero *Bradyrhizobium*. Estudos têm demonstrado que, devido à baixa homologia existente entre as seqüências dos genes *nodY* e *nodK*, aproximadamente 30%, esses podem ser utilizados para a distinção entre *B. japonicum* e *B. elkanii* (Dobert et al., 1994). Em nosso estudo, a análise das seqüências dos genes *nodYA* de *Bradyrhizobium japonicum* e *nodKA* de *B. elkanii*, revelou uma elevada diversidade genética e dividiu as estirpes em três grupos principais. O grupo I reuniu a maioria das SEMIAs analisadas e a estirpe de referência *B. japonicum* (USDA110). Todas as estirpes pertencentes a esse grupo foram relacionadas, com base na análise do 16S RNAr, à espécie de *B. japonicum* ou *Bradyrhizobium* sp. O grupo II reuniu 25 SEMIAs e a estirpe de referência *B. elkanii* (USDA94). Com base na análise do gene 16S RNAr, as estirpes pertencentes a esse grupo foram classificadas como *B. elkanii* ou *Bradyrhizobium* sp.

Com base nas seqüências do 16S RNAr, o grupo III reuniu as estirpes classificadas como *B. elkanii*, no entanto, as seqüências obtidas, após a amplificação com os "primers" descritos por Stener e Parker (1999), não apresentaram similaridade aos genes *nodKA* de *B. elkanii*, ou mesmo a *nodYA* de *B. japonicum*. Dados similares foram observados por You et al. (2002), os quais analisando estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes espécies de *Crotalaria* e *Vigna*, utilizando a técnica de hibridização, observaram a formação de um agrupamento distinto, formado por estirpes incapazes de nodular soja e siratro. Assim como relatado em nosso traba-

lho, essas estirpes diferiram, significativamente, das seqüências obtidas previamente para os genes *nodY* ou *nodK*, fato que levou os autores a sugerirem a presença de um novo gene precedendo os genes *nodABC*.

Não foi possível observar correlação entre a planta hospedeira e os agrupamentos formados, no entanto, todas as estirpes pertencentes ao grupo III são simbioses de leguminosas não relacionadas à soja, sugerindo que, assim como relatado por You et al. (2002), a presença dos genes *nodY* ou *nodK* pode estar relacionada à especificidade à soja.

Considerações Finais

Os resultados obtidos demonstraram elevada diversidade genética entre as estirpes de *Bradyrhizobium* simbioses de distintas leguminosas principalmente quanto aos genes de nodulação *nodY/KA*. Muitos pesquisadores concluem que há uma diversidade genética elevada entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e, desse modo, não deveriam ser nem mesmo agrupadas em um único gênero.

Surge então, uma grande necessidade de caracterizar essas estirpes de forma apropriada, a fim de identificar novas espécies, bem como genes determinantes da especificidade hospedeira e da eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio.

Referências

- DOBERT, R. C.; BREIL, B. T.; TRIPLETT, E. W. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationships to those of other nodulation bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 5, 564-572, 1994.
- FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiology Review**, 58, 501-505, 1994.
- HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobial: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology & Biochemistry**, 29, 819-830, 1997.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene a of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, 29, 315-332, 2006.

STERNER, J. P.; PARKER, M. A. Diversity and relationships of bradyrhizobia form *Amphicarpaeae bracteata* based on partial *nod* and ribossomal sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, 22, 387-392, 1999.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribossomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, 173, 697-703, 1991.

YOU, Z.; MARUTANI, M.; BORTHAKUR, D. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. **Journal of Applied Microbiology**, 93, 577-584, 2002.

Caracterização da estirpe de *Sinorhizobium fredii* CPAC 402: provável evento de transferência lateral de genes simbióticos em solos dos Cerrados entre gêneros distintos de rizóbios

Jesiane Stefania da Silva Batista¹; Fernando Gomes Barcellos²; Pâmela Menna¹; Pedro Alberto Ballati³; Mariangela Hungria⁴. ¹Aluna de Doutorado UEL - DTI CNPq; ²Bolsista ProDoc CAPES; ³Faculdade de Ciências Agrárias e Florestais da Universidad Nacional de La Plata; ⁴Embrapa Soja.

Introdução

A disponibilidade de nitrogênio (N) é um dos fatores nutricionais limitantes à produção agrícola, bem como para a manutenção de ecossistemas. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) constitui a principal via de incorporação do N à biosfera. A simbiose com rizóbios eficientes no processo de FBN pode resultar no fornecimento de todo o N necessário ao desenvolvimento de diversas leguminosas, tais como a soja (Hungria et al., 1994).

O método que vem sendo empregado com maior sucesso no Brasil para a seleção de estirpes adaptadas para a cultura da soja consiste na inoculação de uma área, sucedida por um período de adaptação e o reisolamento das bactérias de nódulos radiculares e verificação da eficiência dessas estirpes.

Uma das estirpes que foi obtida utilizando tal metodologia foi a CPAC 402. Por apresentar características contrastantes em relação à inicialmente inoculada (como acidificação em meio YM acrescido de azul de bromotimol, elevada produção de mucopolissacarídeos e eficiência superior na FBN e nodulação), esta estirpe foi caracterizada geneticamente. Através da análise de genes ribossomais e simbióticos, constatou-se que se tratava de uma estirpe de *Sinorhizobium fredii* provida de genes simbióticos de *Bradyrhizobium japonicum* (dados não apresentados)

A estirpe CPAC 402 foi isolada de nódulo de planta de soja que havia sido inoculada com a estirpe de *B. japonicum* CPAC 7, em um solo dos Cerrados ausente de estirpes bacterianas nativas capazes de nodular e fixar nitrogênio na soja. Desta forma supõe-se que essa possa ser uma estirpe nativa do solo dos Cerrados que tenha adquirido a capacidade de nodular e fixar o nitrogênio em plantas de soja através da transferência lateral de genes a partir da estirpe de *B. japonicum* inoculada.

Objetivos

Caracterizar a estirpe CPAC 402 de *S. fredii* quanto aos parâmetros de produção de melanina, PCR multiplex dos genes *noiXWBTUV* de *S. fredii* e *RSα* de *B. japonicum*, amplificação por PCR e caracterização do gene ribossomal 23S e obtenção do perfil plasmidial.

Material e Métodos

Caracterização da produção de melanina

A produção de melanina foi identificada em algumas espécies bacterianas, inclusive em rizóbios, sendo inicialmente descrita em estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. A estirpe CPAC 402 de *Sinorhizobium fredii* foi testada quanto a tal capacidade, juntamente com estirpes padrões das espécies *S. fredii*, *B. japonicum* e *B. elkanii*, segundo a metodologia descrita por Cubo et al. (1988). Para tanto, as bactérias foram crescidas (3 a 4 dias para as estirpes de crescimento rápido e 7 dias para as de crescimento lento) em meio TY, suplementado com L-tirosina (600µg/ml) e CuSO₄ (40µg/ml). A presença de um pigmento escuro e difuso após a adição de 0,05mL de SDS 10% em TBE e incubação por 24 horas é o indicativo da produção de melanina.

PCR multiplex

Pastorino et al. (2003) desenvolveram uma metodologia sensível e altamente eficiente que possibilita a discriminação entre *S. fredii*, *B. japonicum* e *S. xinjiangensis* em uma única reação de PCR (PCR multiplex), que foi adotada nesta caracterização. Os primers são baseados nas sequências

dos genes *noIXWBTUV* de *S. fredii* e *RSα* de *B. japonicum* e a identificação é feita através da presença/ausência de uma banda de 730kb ou de 900 kb, respectivamente.

Amplificação do gene ribossomal 23S

Variações no tamanho e número de fragmentos amplicados do gene ribossomal 23S são amplamente utilizados na identificação de estirpes (Parker, 2002). Assim, baseando-se em seqüências deste gene depositadas em bancos de dados, Balatti (2005, comunicação pessoal) desenvolveu um par de primers específicos para a amplificação deste gene em estirpes do gênero *Sinorhizobium*, utilizados neste trabalho.

Obtenção do perfil plasmidial

Para analisar a estirpe CPAC 402 quanto à presença e número de plasmídeos, uma metodologia de lise das células diretamente no poço do gel foi adotada. Para tanto, foram obtidas culturas em meio TY das estirpes HH 103, USDA 205 e CPAC 402 de *S. fredii*, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *B. japonicum* e SEMIA 5019 e SEMIA 587 de *B. elkanii*. Após a lavagem das células, as mesmas foram resuspensas em uma solução de resuspensão contendo Tris-ficoll, lisozima, RNase e tampão de corrida e logo aplicadas no poço do gel de agarose.

A eletroforese foi feita em gel de agarose 0,5% em TBE, porém com uma camada (de cerca de 3mm de espessura) de gel de agarose 0,5% + SDS 15% em TBE, disposta atrás do pente acrílico utilizado para formar os poços do gel. O SDS auxilia na lise das células e esta metodologia garante a integridade do DNA plasmidial.

Resultados e Discussão

Produção de melanina

As estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*B. japonicum*) e SEMIA 587 e SEMIA 5019 (*B. elkanii*) apresentaram resposta negativa (dados não mostrados), corroborando com os dados obtidos por Cubo et al. (1988).

Segundo Cubo et al. (1988), na estirpe USDA 205 de *S. fredii*, a produção de melanina parece estar relacionada com a presença de um pequeno plasmí-

deo não-simbiótico; a estirpe HH 103 da mesma espécie também apresentou tal habilidade. No entanto, não foi detectada a produção de melanina pela estirpe CPAC 402, assim como a estirpe SMH 12. A correlação entre produção de melanina e atividade simbiótica ainda não foi estabelecida, porém várias implicações biológicas são sugeridas (Mercado-Blanco et al., 1993).

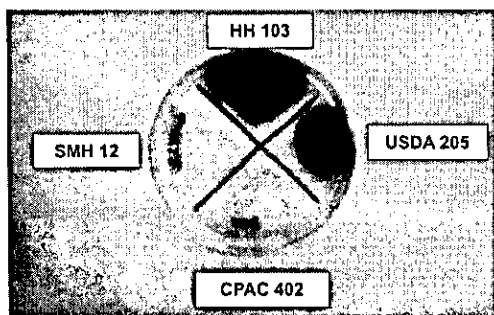


Figura 1. Detecção da produção de melanina por estirpes de *S. fredii*.

PCR multiplex

A Figura 2 apresenta os respectivos produtos obtidos pela reação de PCR multiplex. A estirpe CPAC 402 apresentou tanto a banda característica da espécie *S. fredii* (de 730 kb) quanto o produto de amplificação de seqüências RSα (de 900kb). Goettfert et al. (2002), através do seqüenciamento da ilha simbiótica da estirpe USDA 110 de *B. japonicum* resalta o grande número de cópias de seqüências RSα nesta região, o que foi posteriormente confirmado por Kaneko et al. (2002), que realizou o seqüenciamento do genoma completo da mesma estirpe. Assim, a hipótese de transferência

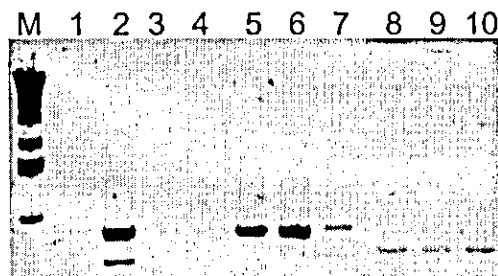


Figura 2. PCR multiplex. M: marcador de peso molecular; 1: SEMIA 134; 2: CPAC 402; 3: SEMIA 103; 4: SEMIA 135; 5: SEMIA 5079; 6: SEMIA 5080; 7: SEMIA 5019; 8: HH 103; 9: USDA 205; 10: USDA 257.

lateral da ilha simbiótica de estirpe inoculante de *B. japonicum* para a estirpe CPAC 402 é novamente evidenciada.

Amplificação do gene 23S rRNA

Os produtos de PCR das estirpes de *S. meliloti* e *S. fredii* apresentaram tamanhos variáveis, entre 506 e 344kb. Como pode ser observado na Figura 3, tanto as estirpes de *B. japonicum* quanto a estirpe USDA 5019 de *B. elkanii* não apresentaram produto de amplificação. A estirpe CPAC 402 de *S. fredii* apresentou uma banda de mesmo peso molecular que a estirpe HH 103 da mesma espécie e das estirpes SEMIA 103, SEMIA 134 e SEMIA 135 de *S. meliloti*. Variações no tamanho entre cópias distintas do gene ribossomal 23S são a provável explicação para as múltiplas bandas encontradas na estirpe SEMIA 6161 e USDA 257, como previamente descrito por Laguerre et al. (1996).

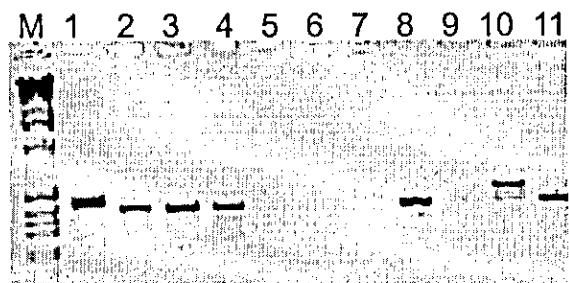


Figura 3. Produtos de amplificação por PCR utilizando primers específicos para região do gene ribossomal 23S rRNA do gênero *Sinorhizobium*. M: marcador de peso molecular; 1:SEMIA 6161; 2:SEMIA 103; 3:SEMIA 134; 4:SEMIA 135; 5:SEMIA 5079; 6:SEMIA 5080; 7:SEMIA 5019; 8: CPAC 402; 9: 9.8; 10:USDA 257; 11:HH 103.

Obtenção do perfil plasmidial

Como pode ser visto na Figura 4 e corroborando com experimentos anteriores, as estirpes estudadas de *B. japonicum* e *B. elkanii* não possuem plasmídeos. A estirpe CPAC 402 apresentou quatro plasmídeos, assim como a estirpe USDA 205; no entanto, o quarto plasmídeo apresentado no perfil possui tamanho menor do que o menor plasmídeo da USDA 205.

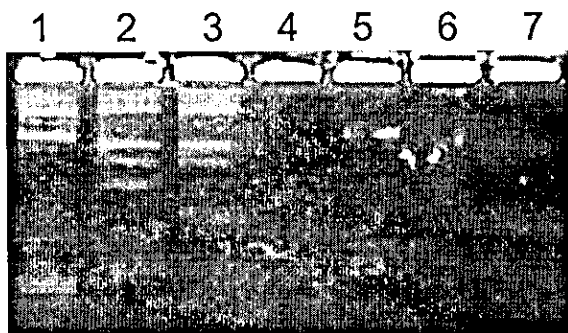


Figura 4. Perfil plasmidial das estirpes: 1:HH 103; 2:USDA 205; 3:CPAC 402; 4: SEMIA 5079; 5:SEMIA 5080; 6:SEMIA 587 e 7:SEMIA 5019.

Considerações Finais

A transferência lateral de genes simbióticos possui grande importância, pois capacita a bactéria a explorar um novo nicho ecológico. Além disso, a ocorrência de tal processo abre novas perspectivas ao estudo da taxonomia dos rizóbios. Os resultados obtidos com o presente estudo permitiram a identificação da ocorrência da transferência horizontal de gentes simbióticos a partir de estirpe inoculada para rizóbio nativo dos solos dos Cerrados (CPAC 402), bem como demonstrar as características mistas desta estirpe. O conhecimento da ocorrência desses eventos permitirá o desenvolvimento de novas estratégias para a busca de estirpes de rizóbios mais eficientes e competitivas na FBN.

Referências

- CUBO, M. T.; BUENDIA-CLAVERIA, A. M.; BERINGER, J. E.; RUIZ-SAINZ, J. E. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 7, p. 1812-1817, 1988.
- MERCADO-BLANCO, J.; GARCIA, F.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; OLIVARES, J. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 17, p. 5403-5410, 1993.

PASTORINO, G. N.; MARTINEZ ALCANTARA, V.; BALATTI, P. A. Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* [L.] Merr) by a multiplex PCR reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 2, p.153-158, 2003.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v. 9, n. 6, p.189-197, 2002.

GÖTTTFERT, M.; RÖTHLISBERGER, S.; KÜNDIG, C.; BECK, C.; MARTY, R.; HENNECKE, H. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1405-1412, 2001.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.; CHARNAY, M.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of Rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2029-2036, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2a. Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.

Transferência horizontal de genes simbióticos de estirpes inoculantes de *B. japonicum* para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados

Fernando Gomes Barcellos¹; Pâmela Menna²; Jesiane Stefânia da Silva Batista³; Mariangela Hungria⁴. ¹Bolsista ProDoc Capes; ²Bolsista de Doutorado do CNPq; ³Bolsista de Doutorado da CAPES; ⁴Embrapa Soja.

Introdução

Com o seqüenciamento de vários genomas bacterianos tem sido identificada uma alta percentagem de genes resultantes de eventos de transferência horizontal de genes ("horizontal gene transfer", HGT), o que tem gerado amplas discussões sobre conceitos básicos em relação à evolução e especiação em bactérias (Gogarten & Townsend, 2005). A identificação da ocorrência de transferência horizontal de genes entre bactérias em ambientes naturais tem possibilitado um melhor entendimento dos mecanismos de evolução, adaptação e ocupação de novos nichos ecológicos.

Acumulam-se, também, evidências de que a HGT entre diferentes espécies de bactérias pode ocorrer em todas as categorias funcionais de genes, inclusive os ribossomais, considerados como altamente conservados e utilizados, hoje, como a principal ferramenta da taxonomia. Com isso, um quadro com espécies bem definidas de procariotos parece cada vez mais distante, ocorrendo a sobreposição generalizada de várias regiões genômicas entre espécies distintas (Gogarten & Townsend, 2005).

Não há praticamente informação sobre eventos de HGT entre bactérias nos solos brasileiros. Uma situação comum e com alta probabilidade de HGT pode residir nos processos de introdução e estabelecimento, no solo, de populações de estirpes exógenas de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* pela inoculação de sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.). Atualmente,

populações de estirpes inoculantes estão estabelecidas em grande parte do território nacional, em cerca de 22 milhões de hectares e têm sido estimadas em 10^2 a 10^6 células viáveis g^{-1} de solo. Torna-se fundamental, portanto, identificar eventos de HGT entre as estirpes exógenas e as populações nativas de rizóbios do solo. Neste trabalho são mostradas evidências de HGT em solos dos Cerrados, com a descrição de duas estirpes nativas de rizóbios contendo genes simbióticos de estirpes de *B. japonicum* utilizadas como inoculantes.

Objetivos

Caracterizar genotipicamente estirpes de rizóbios, isoladas a partir de nódulos de soja, com o objetivo de identificar a ocorrência da transferência horizontal de genes simbióticos a partir de estirpes utilizadas nos inoculantes para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados.

Material e Métodos

As estirpes de rizóbios utilizadas estão descritas na Tabela 1. As estirpes foram isoladas a partir de nódulos de soja em Planaltina, DF, de uma área cultivada com essa leguminosa há 15 anos. A área era, originalmente, ausente de rizóbios capazes de se associar simbioticamente com a soja e recebeu inoculantes contendo exclusivamente as estirpes de *B. japonicum* SEMIA 566 ou SEMIA 586 (Boddey & Hungria, 1997; Santos et al., 1999).

Inicialmente, as estirpes foram avaliadas quanto à eficiência do processo de fixação biológica do N_2 , em experimento conduzido em substrato estéril e condições controladas de casa-de-vegetação, em blocos ao acaso, com três repetições. Foram determinados os parâmetros de nodulação (número e massa de nódulos), crescimento das plantas (massa da parte aérea) e capacidade de fixação do N_2 (N total acumulado na parte aérea), segundo Santos et al. (1999). Os dados foram submetidos à análise estatística (Tukey, $p \leq 0,05$). Para as avaliações morfológicas (morfologia das colônias) e fisiológicas (taxa de crescimento e reação alcalina ou ácida *in vitro*), as

Tabela 1. Estirpes de rizóbios analisadas.

Estirpes	Sorogrupos	Observações
SEMIA 566	566	Isolada de inoculante norte-americano em 1966.
CPAC 15 (=SEMIA 5079)	566	Variante natural da SEMIA 566 adaptada aos solos de Cerrados e com maior capacidade de fixação de N ₂ do que a parental.
S 127, S 340, S 370, S 372, S 478, S 490, S 516	566	Variantes naturais da SEMIA 566, obtidas pelo mesmo processo de seleção da CPAC 15.
SEMIA 586	586	Estirpe recebida da Austrália em 1966.
CPAC 7 (=SEMIA 5080)	586	Variante natural da SEMIA 586, adaptada aos solos dos Cerrados e com maior capacidade competitiva do que a parental.
CPAC 390, CPAC 392, CPAC 394, CPAC 402, CPAC 403, CPAC 404	586	Variantes naturais da CPAC 7, obtidas pelo mesmo processo de seleção da CPAC 7.

estirpes foram crescidas por sete dias em meio com extrato de levedura e manitol contendo vermelho Congo ou azul de bromofenol. A caracterização genética das estirpes foi realizada pela metodologia de *rep*-PCR ("polymerase chain reaction"), pela amplificação do DNA das bactérias com "primers" (REP e BOX-A1R) que reconhecem regiões repetitivas e conservadas do DNA, normalmente intergênicas, segundo as metodologias descritas por Santos et al. (1999) e Versalovic et al. (1994), respectivamente. O gene ribossomal 16S foi amplificado e caracterizado por PCR-RFLP ("restriction fragment length polymorphism") e seqüenciamento, conforme descrito por Germano et al. (2006) e Menna et al. (2006), respectivamente. Os genes *nodY*, *nodA*, *nodC* e *nifH* foram analisados comparativamente quanto aos perfis de PCR-RFLP e pelas seqüências nucleotídicas, segundo Laguerre et al. (2001).

Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações da eficiência na fixação biológica do N_2 demonstraram que a maioria das estirpes variantes naturais da SEMIA 566 apresentou valores superiores em todos os parâmetros avaliados, em relação à estirpe parental, o que não ocorreu com as variantes da estirpe SEMIA 586, uma vez que essas foram selecionadas para maior competitividade (dados não apresentados).

As 17 estirpes foram comparadas por *rep*-PCR e os resultados são apresentados na Figura 1. Com exceção da CPAC 402 e da S 127, as estirpes pertencentes ao mesmo sorogrupo foram agrupadas com um nível de similaridade superior a 85%, indicando um grau elevado de relação genética dentro de cada sorogrupo. Além disso, a S 127 apresentou características típicas de *Bradyrhizobium in vitro*, enquanto a CPAC 402 acidificou o meio

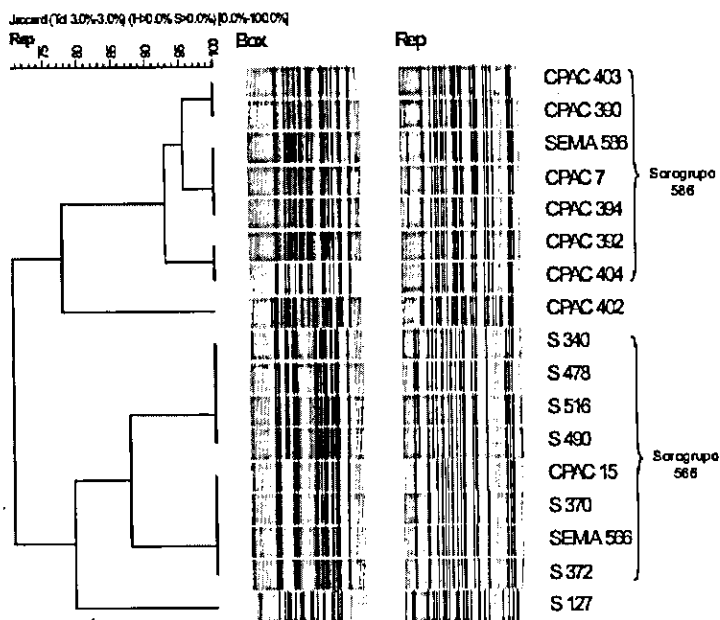


Figura 1. Agrupamento das estirpes de rizóbios com base nos marcadores BOX A1R e REP, utilizando o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method, with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

e apresentou grande produção de muco. A CPAC 402 e a S 127 também apresentaram perfis bastante distintos na análise de PCR-RFLP do 16S rDNA (dados não apresentados), indicando que essas estirpes não pertencem à espécie *B. japonicum*.

Pelo seqüenciamento total dos genes 16S rRNA, foi possível identificar que a S 127 apresenta similaridade de bases com a espécie *B. elkanii*, enquanto a CPAC 402 com *Sinorhizobium fredii*. O seqüenciamento dos genes simbióticos relacionados à nodulação (*nod*) e fixação do N_2 (*nif*), *nodY*, *nodA*, *nodC* e *nifH* das estirpes S 127 e CPAC 402 foi realizado, buscando informações sobre possíveis transferências laterais de genes. A estirpe S 127 de *B. elkanii* apresenta o gene *nodC* originário de *B. japonicum*, enquanto os demais genes analisados são endógenos da própria espécie. Os genes *nod* da CPAC 402 de *S. fredii* são originários de *B. japonicum*, mas foram identificadas duas cópias do gene *nifH*, uma endógena de *S. fredii* e outra originária de *B. japonicum*.

Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que genes simbióticos foram, provavelmente, transferidos horizontalmente das estirpes inoculantes de *B. japonicum*, dos sorogrupos SEMIA 566 e SEMIA 586, para duas outras espécies de rizóbios nativos dos solos dos Cerrados, *Sinorhizobium fredii* e *Bradyrhizobium elkanii*. O entendimento dos mecanismos de HGT e seu efeito na simbiose com a cultura da soja é essencial para a busca de novas estratégias para a obtenção de estirpes de rizóbios mais eficientes e competitivas.

Referências

- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 407-415, 1997.
- GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains

from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.

GOGARTEN, J. P.; TOWNSEND, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. **Nature Reviews**, v. 3, p. 679-687, 2005.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, p. 981-993, 2001.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematics and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.

SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 261-272, 1999.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods of Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

Avaliação da resistência de genótipos de soja dos grupos de maturação M e N a percevejos sugadores de semente

José Perez da Graça^{1,2}; Oriverto Tonon²; Lenita Jacob Oliveira²; Clara Beatriz Hoffmann-Campo². ¹Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes-PR; ²Embrapa Soja.

Introdução

Os insetos-praga constituem importante fator de redução da produtividade em diversas espécies vegetais cultivadas. No caso da soja, os percevejos, em especial as espécies *Piezodorus guildinii*, *Euschistus heros* e *Nezara viridula*, representam uma séria ameaça à produção e à qualidade da semente, dependendo da densidade populacional e da época de ataque à cultura (Hoffmann-Campo et al., 1996).

O ataque de percevejos, durante a fase de formação de grãos, pode causar enrugamento e deformações, além de retenção foliar ou presença de hastes verdes no momento da colheita (Gazzoni, 1998; Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999).

As pragas da soja têm sido controladas, principalmente, por inseticidas químicos, mas várias outras técnicas, como o controle biológico e a resistência varietal, também têm sido pesquisadas. Apesar da importância dos inseticidas no controle de pragas, o uso indiscriminado é ecologicamente nocivo, por causar resistência em pragas principais e surtos de pragas secundárias, além disso, proporcionam efeitos adversos em organismos benéficos, resíduos indesejáveis nos alimentos, danos diretos aos aplicadores, e aumento no custo de produção.

A utilização de cultivares resistentes a insetos é, provavelmente, o único método de controle que pode atender, concomitantemente, aos requisitos de garantia de qualidade na produção, custo comparativo menor e maior facilidade de utilização da tecnologia. A substituição de um controle químico

co com inseticidas, por um controle natural de percevejos na cultura soja, potencializa a adoção desta tecnologia em larga escala e no médio prazo (Gazzoni, 1994).

A utilização de genótipos com essas características de defesa (resistência) a insetos pode diminuir a incidência das pragas, resultando em menor perda de produção. Alguns genótipos de soja, na presença de percevejos, têm se mostrado promissores, apresentando menor dano após o ataque (Hoffmann-Campo et al., 2000).

Objetivos

Verificar a suscetibilidade de diversos genótipos de soja aos percevejos sugadores de semente.

Material e Métodos

No campo experimental da Embrapa Soja, vinte e 23 cultivares do Programa de Melhoramento (Tabela 1), separadas em dois grupos, N (tardio) e M (Semi-precoces), foram avaliadas na presença de infestação natural de percevejos (*P. guildinii*, *E. heros* e *N. viridula*). As parcelas experimentais constaram de quatro linhas de 4 m de comprimento, separadas por 0,50 m de espaçamento, num total de 6 m². Durante os 21 dias após infestação, foram feitas de uma a três aplicações de inseticida para a manutenção da infestação abaixo do nível de dano. Ao final do ensaio foi realizada a coleta dos grãos das linhas centrais para a análise da qualidade e a produção. A análise de qualidade da semente foi visual, calculando a porcentagem de sementes sobre o total colhido, separando as em boas, médias e ruins, conforme o sintoma do dano por percevejo. Foram avaliados a porcentagem de grãos e produção.

Resultados

Porcentagem de sementes boas, médias e ruins nos grupos de maturação M e N

Tabela 1. Genótipos testados e número de aplicações de inseticidas para o controle de percevejos sugadores de sementes.

Grupo M	Nº de aplicações	Grupo N	Nº de aplicações
BRI01-22379	1	BRI 01-15067	2
BRI01-22430	1	BRI01-21523	1
BRI01-20552	1	BRI01-21851	2
BRI01-895	1	BRI01-18344	1
BRI01-7346	1	BRI01-7316	2
BRI98-18797	1	BRI01-11556	2
BRI98-641	1	BRQ96-3065	1
BRQ95-115	1	BRQ95-799	3
EMBRAPA-48	3	BRS-134	2
BRS-134	1	BRS-215	2
DOWLING	1	BRI03-3887	2
		BRI03-5376	2

Os resultados do grupo (M) são mostrados na Figura 1A. Para esse grupo, o maior e o menor percentual de sementes boas (%SB) foi observado nos genótipos BR01-895 e BRI01-20552. Para semente média (%SM), observou-se o oposto, com a maior %SM, sendo produzido pela cultivar BRI01-20552 e a menor por BRI01-895. A maior porcentagem de semente ruim (%SR) foi verificada em BRI98-641, e a menor na cultivar Dowling.

Em relação aos resultados referentes ao grupo N (Fig. 1B), observou-se que a BRQ96-3065 apresentou maior %SB que BRI01-21523. A maior %SM foi atribuída a BRI01-11556 e a menor BRQ96-3065. A maior %SR foi observada em BRI01-21523 e a menor em BRQ96-3065.

Segundo os níveis de danos observados em cada um dos tratamentos do grupo M foi realizada uma aplicação de inseticida (Tabela 1), exceto na parcela testemunha, Embrapa-48, onde foram feitas três aplicações. O número de aplicações de inseticidas foi maior no grupo N, onde a maioria dos genótipos recebeu duas pulverizações. Entretanto, os genótipos BR01-21523, BR01-18344 e BRQ 3065 não atingiram o nível de dano e foram pulverizados apenas uma vez. A linhagem BRQ95-799 necessitou de três pulverizações devido o nível do dano ter atingido valores superiores ao permitido.

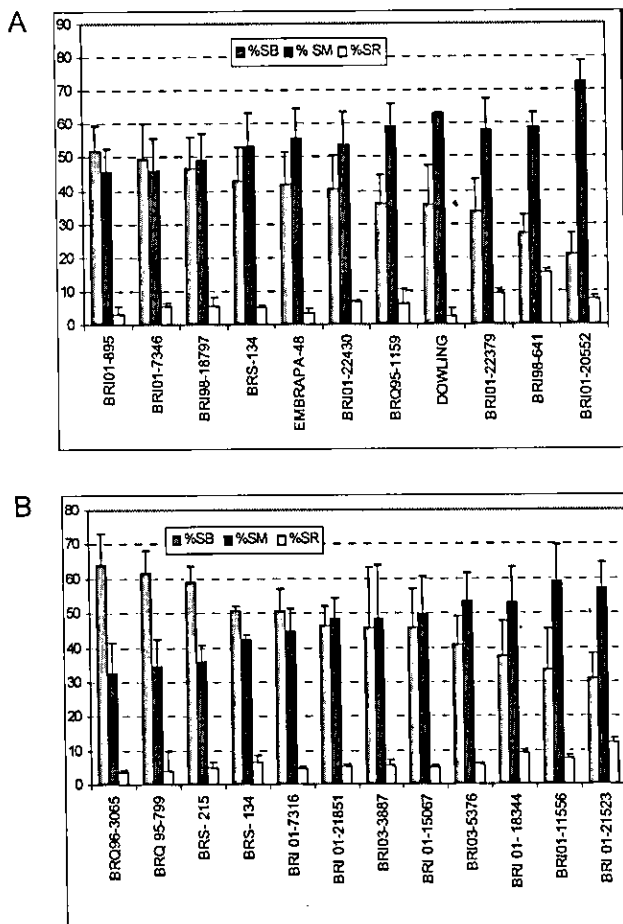


Figura 1. Porcentagem de sementes boas, médias e ruins de soja, em genótipos dos grupos de maturação M (A) e N (B).

Produção de grãos e Porcentagem nos genótipos do grupos de maturação M e N

Os resultados da Figura 2A para os materiais do grupo M, evidenciam que a maior produção foi obtida pela cultivar BRS-134 (2.474 kg/ha), e a menor para BRI01-20552 (1.512 kg/ha). O maior percentual de grãos (%SB + %SM) ocorreu na cultivar Dowling e o menor na linhagem BRI98-641.

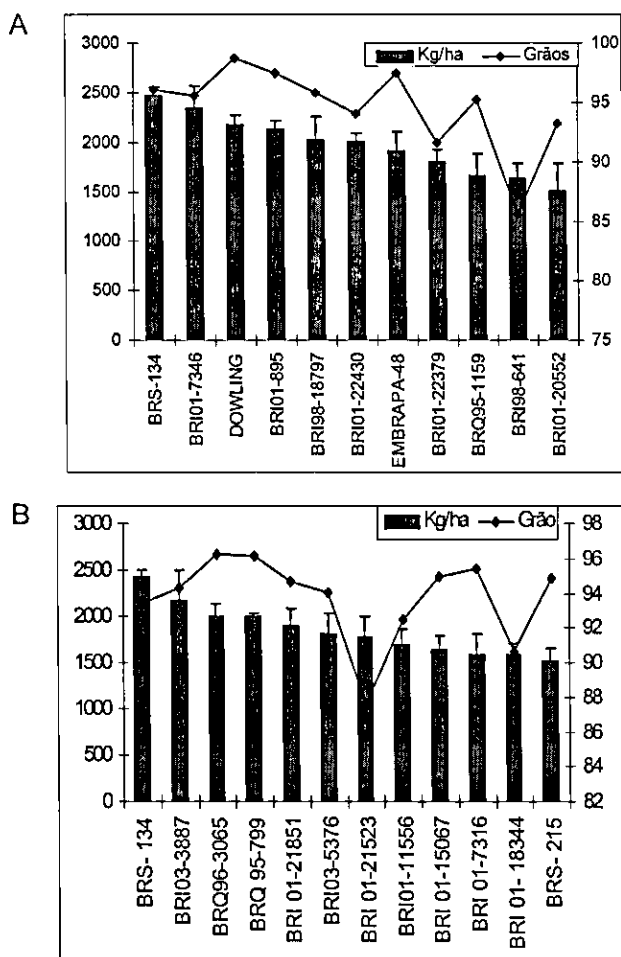


Figura 2. Produção (kg/ha) por parcela e percentagem de grãos (%SB + %SM)

Os dados referentes ao grupo N estão descritos na Figura 2B. A cultivar BRS-134 foi a mais produtiva (2.430 kg/ha) e a menos produtiva foi BRS-215 (1.512 kg/ha). A maior percentagem de grãos foi verificado pelo genótipo BRQ96-3065 e a menor em BRI01-21523.

Os dados obtidos sugerem que para o grupo M, o genótipo mais promissor como fonte de resistência foi BRI01-895, q por produzir mais de 2.000

kg/ha e com porcentagem de grãos acima de 90%. No grupo N, apenas dois genótipos produziram acima de 2.000 kg, BRS-134 e BRQ96-3065, tendo esse último apresentado a maior % SB, com apenas uma aplicação de inseticida.

Referências

- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. EMBRAPA-CNPSO, Londrina, PR, Brasil, 1999. (EMBRAPA-CNPSO Circular Técnica, 24).
- GAZZONI, D. L. **Manejo de pragas da soja: uma abordagem histórica**. Londrina: Embrapa- CNPSO, 1994, 72 p.
- GAZZONI, D. L. Efeito de populações de percevejos na produtividade, qualidade da semente e características agronômicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1229-1237, 1998.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; GAZZONI, D. L.; TOLEDO, J. F. Comparação de métodos para avaliação de linhagens de soja resistentes a percevejos (Hemiptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 305-316, 1996.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI F.; OLIVEIRA, L. J.; CORRÊA, B. S.; PANIZZI, A. R.; GAZZONI, D. L.; SOSA-GOMEZ, D. R.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina, EMBRAPA Soja, 2000. 70 p. (Circular Técnica/Embrapa soja; n 30).

Patogenicidade e caracterização molecular de *Myrothecium roridum* Tode Ex Fr., isolado de plantas de soja, algodão e melão

Camila N. Lazarin^{1,2}; José Perez da Graça^{2,3}; Silvana R. R. Marin²; Nilson Darlan Vieira²; Eliseu Binneck²; Maurício Conrado Meyer²; Claudine Dinali Santos Seixas²; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida². ¹Centro Universitário Filadélfia, Londrina-PR; ²Embrapa Soja; ³Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes-PR.

Introdução

A mancha foliar de mirotécio em soja, causada por *Myrothecium roridum*, foi descrita no Brasil, em 1980 (Almeida et al., 1980) e, recentemente, em algodão (Chitarra & Meyer, 2004).

Isolados mantidos em meio de cultura, como BDA, apresentam diferentes coloração e morfologia micelial.

Segundo Lima et al. (1997), foram detectadas variabilidade morfológica e variações na atividade de isoesterase entre isolados de *M. roridum*, obtidos de leucena e melão. Aparentemente, essas características mostravam a ocorrência de variabilidade genética do patógeno, como observado por Graça, J. P. (Comunicação pessoal, 2005).

Embora a utilização de avaliações morfológicas e isoenzimáticas sejam úteis, métodos moleculares têm proporcionado melhores resultados no estudo da diversidade genética entre isolados.

Este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética de isolados de *M. roridum*, obtidos de soja, algodão e melão, utilizando marcador molecular tipo RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) e comparações quanto ao tamanho de fragmentos amplificados da região ITS (Internal Transcribed Spacer).

Material e Métodos

Vinte e três isolados obtidos de plantas de soja, algodão e melão (Tabela 1) foram utilizados para análises morfológica e molecular. Isolados desenvolvidos em meio de BDA (batata-dextrose-agar) foram incubados a 26°C e, posteriormente, repicados a partir de um único conídio, originando culturas monospóricas, utilizadas neste trabalho. Os conídios foram raspados da superfície da colônia desenvolvida e utilizados para avaliação do tamanho longitudinal. Trinta conídios foram avaliados, descartando-se a maior e a menor leitura.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Myrothecium roridum*.

	Isolado	Local de coleta	Material de isolamento
1	MA-20	Balsas-MA	Folha soja
2	MA-67	Tasso Fragoso-MA	Folha algodão
3	MA-72	Riachão-MA	Bráctea algodão
4	MA-73	Riachão-MA	Folha soja
5	MA-74	Riachão-MA	Folha algodão
6	MA-75	Tasso Fragoso-MA	Folha algodão
7	MA-76	Tasso Fragoso-MA	Maça algodão
8	MA-77	Tasso Fragoso-MA	Folha soja
9	MA-81	Riachão-MA	Folha soja
10	MA-82	Tasso Fragoso-MA	Folha algodão
11	MA-83	Tasso Fragoso-MA	Semente soja
12	MA-84	Tasso Fragoso-MA	Semente soja
13	781	Monte Carmelo-MG	Folha soja
14	782	UFRPE-Recife-PE	Raiz melão
15	783	UFRPE-Recife-PE	Raiz melão
16	784	UFRPE-Recife-PE	Fruto melão
17	785	UFRPE-Recife-PE	Fruto melão
18	787	PA	Soja
19	789	MT	Soja
20	790	MT	Soja
21	791	TO	Soja
22	792	BA	Soja
23	793	MG	Soja
24	794	GO	Soja

Cada isolado foi cultivado em meio líquido e o micélio formado, após lavado, foi utilizado para extração de DNA, (Almeida et al., 2003). O DNA de cada amostra foi mantido a - 20°C até ser utilizado em RAPD (Williams et al., 1990), com o uso de primers decâmeros ou para amplificação da região ITS, utilizando primers descritos por White et al. (1997).

Resultados e Discussão

Este trabalho constitui a primeira demonstração científica da diversidade genética de isolados de *Myrothecium roridum*, no Brasil, por meio de métodos moleculares. Vinte e três isolados obtidos de algodão, soja e melão foram agrupados em nove grupos, de acordo com os coeficientes da matriz de similaridade, estabelecendo um corte de 80% de similaridade genética.

Os grupos A, B, C, F e G foram constituídos com apenas um isolado, enquanto os grupos D e E possuem 15 e 3 isolados, respectivamente (Fig. 1). Os coeficientes de similaridade do grupo D variou de 80 % a 100%, enquanto a variação no grupo E foi de 81% a 100%.

As diferenças observadas mostram que a maioria dos isolados de soja, algodão e melão possuem alta similaridade. No entanto, há três isolados de soja (MA-20, MA-73, MA-83) e um de melão (781) que apresentam baixa similaridade com os demais. Os isolados do Maranhão (grupos D e E) apresentam alta similaridade.

A amplificação da região ITS mostrou que o tamanho do fragmento de DNA amplificado pelos primers ITS1 e ITS4, que corresponde à região entre os genes 16S e 23S e inclui o gene 5,8 S foi de 620 pb. Estudos adicionais com digestão por enzimas de restrição estão em andamento.

As médias das avaliações de comprimento dos conídios estão entre as médias citadas para este gênero. No entanto, os isolados 783 e MA-77 apresentaram o maior (8,64 µm) e o menor (5,94 µm) comprimento, respectivamente.

Os dados obtidos sugerem que, há significativa diversidade genética entre os isolados de *M. roridum*, o que deve ser considerado num programa de melhoramento genético.

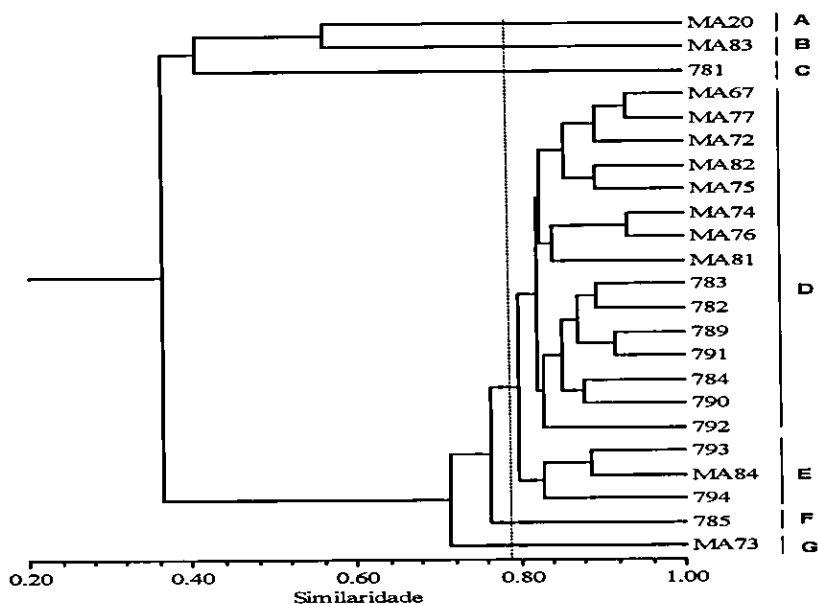


Figura 1. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com RAPD para 24 isolados de *Myrothecium roridum*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de DICE (UPGMA).

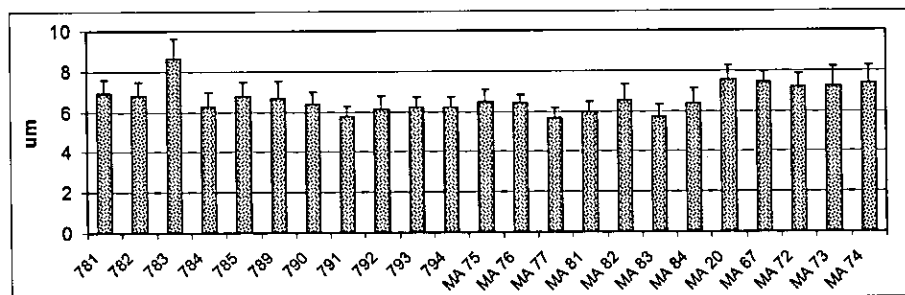


Figura 2. Tamanho médio de conídios de diferentes isolados de *Myrothecium roridum*, desenvolvidos em meio de batata-dextrose-agar.

Referências

- ALMEIDA, A. M. R.; KASTER, M.; ALBUQUERQUE, F. C. Ocorrência de *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. Soja (*Glycine max*) (L.) Merrill) no Estado do Piauí. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 129-133, fev. 1980.
- ALMEIDA, M. R. A.; ABDELNOOR, R. V.; ARIAS, C. R. A.; CARVALHO, W. P.; JACOUD, D. S.; MARIN, S. R. R.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; CARVALHO, C. G. P. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia brasileira** v. 28, p. 270-285, 2003.
- CHITARRA, L. G.; MEYER, M. C. Primeiro relato da mancha de *Myrothecium* em algodão, no Estado de Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 543, 2004.
- GRAÇA, J. P. da. **Relatório de Estágio**. Londrina, 2005. 25p.
- LIMA, G. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Cultural and morphological characteristics, and isoesterase activity of *Myrothecium roridum* isolates. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 131-134, 1997.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. A.; TINGGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.) **PCR Protocol, a guide to methods and applications**, San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1997.

Panorama genômico da estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, recomendada para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja

Leandro Pereira Godoy^{1,2}; Lígia Maria de Oliveira Chueire¹; Fernando Gomes Barcellos^{1,2}; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos³; Luiz de Paula Gonzaga³; Marisa Fabiana Nicolás³; Rangel C. Souza³; Mariangela Hungria¹. ¹Laboratório de Biotecnologia dos solos, Embrapa Soja, godoylp@cnpso.embrapa.br; ²Universidade Estadual de Londrina; ³Laboratório Nacional de Computação Científica. Agência financiadora: CNPq.

Introdução

A cultura da soja se beneficia do processo de fixação biológica do N₂ (FBN), dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para a formulação de inoculantes comerciais no Brasil, duas pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (recomendada no período de 1968 a 1975 e após 1979) e a SEMIA 5019 (=29W), recomendada desde 1979 e duas estirpes de *B. japonicum* selecionadas pela Embrapa Cerrados, a SEMIA 5079 (=CPAC 15) e a SEMIA 5080 (=CPAC 7), que vêm sendo recomendadas desde 1992. (Hungria et al., 2006). A estirpe SEMIA 5079 pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566 e, no Brasil, essas estirpes apresentam baixa competência saprofítica, contudo, logo depois se estabelecem no solo fortemente (Hungria et al., 2006).

A importância de determinação dos genes da estirpe SEMIA 5079, de alta competitividade e eficiência de fixação do N₂ reside em que, com o lançamento de cultivares de soja mais produtivas, uso de novas práticas agrícolas e o cultivo em solos inoculados anteriormente, torna-se necessário selecionar estirpes mais eficientes e competitivas, bem como isso irá facilitar a identificação das estirpes estabelecidas nos solos brasileiros, para futuros estudos em FBN.

Realizar o seqüenciamento completo de um genoma de bactéria, porém, é um processo caro e demorado, que está muito além da capacidade da maioria dos laboratórios. Uma estratégia alternativa seria a de seqüenciamento parcial de genomas. Está demonstrado, por exemplo, que informações importantes e representativas da estrutura e do conteúdo do genoma de *Sinorhizobium fredii* NGR234 puderam ser obtidas a partir do seqüenciamento parcial e ao acaso de bibliotecas de DNA do tipo "shotgun" (Viprey et al., 2000).

Para o desenvolvimento deste trabalho, o objetivo foi de realizar a cobertura de 10% a 15% do genoma da estirpe SEMIA 5079, procurando genes relacionados à capacidade saprofítica, à competitividade e à eficiência do processo de fixação biológica do N_2 .

Material e Métodos

A partir dos péletes obtidos de células da estirpe SEMIA 5079, crescida em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989), centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e estocagem a -70°C , o DNA genômico das bactérias foi extraído pelo método usual descrito por Sambrook et al. (1989).

O preparo da biblioteca "shotgun", conforme descrito por Fleishmann et al. (1995), envolveu a purificação do DNA e fragmentação ao acaso, por meio mecânico (nebulização). O DNA misturado com glicerol a 50% e NaOAc 3M foi nebulizado por 30 segundos a uma pressão de 2 kgf cm^{-2} , a fim de obter fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 3 kb. A fragmentação foi confirmada em gel de agarose a 1%. A seguir, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Os fragmentos foram separados em gel de agarose "low melting" (g.a.). Após a recuperação dos fragmentos a partir do gel de agarose, os mesmos foram colocados para se ligarem ao vetor pUC18 digerido com a enzima de restrição *Sma*I-BAP e defosforilados com a enzima T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe DH10B, através da técnica de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (Sambrook et al., 1989) contendo ampicilina (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), IPTG e X-gal e as bactérias foram crescidas durante a noite a 37°C .

No processo de seqüenciamento, colônias brancas individuais (clones recombinantes) foram inoculadas em placas de crescimento de cultura com 96 poços contendo meio "Terrific Grow - TB" (Invitrogen™). As bactérias foram crescidas com agitação de 150 rpm, a 37°C, "overnight". As placas de crescimento de cultura foram utilizadas para estoque em glicerol (80%), sendo então reinoculadas. Após o crescimento, foram obtidos péletes por centrifugação a 4.000 rpm, por 8 min. O DNA foi, então, extraído pelo método de rompimento alcalino. Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes foram seletivamente precipitados com KOAc 3M (acetato de potássio estocado a 4 °C, pH 4,7-4,9). O sobrenadante foi filtrado por filtros últiplos (MultiScreen, Millipore) para obtenção do DNA que através da filtragem e purificação, foi ressuspensão em água, verificando a concentração em gel de agarose a 1%. O DNA precipitado foi seqüenciado utilizando o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator". As reações de PCR foram realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso", para a amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes.

As leituras obtidas foram submetidas à análise de bioinformática, realizada no LNCC, com o "software" para SABIÁ (System of Automated Bacterial Integrated Annotation), que integra vários programas de domínio público para a montagem e a anotação de genomas (Almeida et al., 2004).

Resultados e Discussão

Foi validada uma biblioteca, totalizando 2.198 leituras, 88% com boa qualidade, possuindo menos de 10% de vetores. Foram lidas 24 placas, que resultaram em 2.470.301 pares de bases (pb), 1.036.812, as quais com qualidade igual ou superior a 20 (Tabela 1). Estimando o genoma em 9.000.000 de pb, essas bases de boa qualidade seriam suficientes para cobrir cerca de 11,5% do genoma. Contudo, pela natureza da biblioteca "shotgun", em que vários fragmentos correspondem a seqüências idênticas, a cobertura obtida, até o presente momento, é de 6,63% (Tabela 1).

Tabela 1. Leituras e cobertura obtidas no genoma de *B. japonicum* SEMIA 5079 (CPAC 15).

Parâmetro	Situação
Número de bases depositadas (bp) (sem vetor)	2.470.301 (100%)
Número de bases com qualidade ≥ 20 (bp)	1.036.812 (39,43%)
Número de bases com qualidade ≥ 30 (bp)	744.334 (28,31%)
Número de bases de vetor (bp)	158.931 (6,04%)
Média do tamanho das leituras (bp)	1123,89
Número total de leituras	2.198
Número de leituras de bases sem vetor ($\leq 10\%$ vetor)	1.939
Número de leituras de 10-80% de bases de vetor	211
Número de leituras com mais que 80% de bases com vetor	48
Tamanho estimado do Genoma (bp)	9.000.000
Cobertura do Genoma	597.517 (6,63% do tamanho estimado do genoma)

A busca de genes putativos com ferramentas da bioinformática já resultou em 560 "contigs", definindo, cada um, no mínimo uma ORF ("open reading frame") ou "CDS" (coding DNA sequence). Comparando com o genoma já seqüenciado da estirpe USDA 110 de *B. japonicum*, em que foram encontradas 8.317 CDSs (Kaneko et al., 2002), o número já detectado nessa etapa inicial do panorama genômico é equivalente a, no mínimo, 6,7% dos genes putativos da SEMIA 5079. Já foram identificados, nesta estirpe, genes putativos que codificam enzimas do metabolismo do N, como a glutamato sintetase e a urease, do metabolismo dos ácidos graxos, do metabolismo do Fe, como a bacterioferretina e receptores de Fe, que podem estar envolvidos, tanto com a capacidade competitiva, através da produção de sideróforos, como com a absorção do Fe, genes condicionando a síntese de flagelos, entre outros. Também foram identificados genes de nodulação (*nodI*, *nodN*) e fixação de N_2 (*fixG*, *fixK2*, *fixJ*, *fixL*, *fixN*, *fixO*, *fixP*, *fixQ*).

Conclusão

A estratégia alternativa de seqüenciamento parcial de genomas por "shotgun" mostra-se eficiente para a prospecção de genes de interesse, relacionados à fixação do N_2 , à capacidade saprofítica e à competitividade da estirpe SEMIA 5079.

Referências

- ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; BARRIENTOS, J. A.; SANTOS, M. T.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A system for automated bacterial (genome) integrated annotation – SABIA. *Bioinformatics*, v. 20, p. 2832-2833, 2004.
- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMP, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, Washington, v. 269, p. 496-512, 1995.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K., Ed. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2006. p. 43-93.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, Kisarazu, v. 9, p. 189-197, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. K.; PERRET, X.

Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v. 1, p. 1-17, 2000. (<<http://genomebiology.com/2000/1/6/research/0014.1>>).

Produção de fitoalexinas e suscetibilidade de diversos genótipos de soja ao tamanduá-da-soja *Sternechus subsignatus* em casa de vegetação

Marcos Zambon Abrão^{1,2,3}; Clara Beatriz Hoffmann-Campo³; Lenita Jacob Oliveira³; Antonio Carlos Ferreira Mendes³; A. C. B. Oliveira³. ¹Estudante Centro Universitário Filadélfia, Londrina, PR, abrao@cnpso.embrapa.br; ²Bolsista PIBIC/CNPq; ³Embrapa Soja.

Introdução

A soja é hospedeira de um número considerável de insetos-pragas, no Brasil (Hoffmann-Campo et al., 2000). Os mais frequentes e capazes de causar danos severos na soja são *Anticarsia gemmatilis* (Hübner), *Euschistus heros* (Fabricius), *Nezara viridula* (Linnaeus) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Panizzi & Correa-Ferreira, 1997). Entretanto, existem outros insetos que, embora tenham distribuição mais restrita, também possuem alta capacidade de causar danos à cultura.

O tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus* Boheman) começou a ser observado em lavouras de soja, a partir de 1973, em algumas áreas da região tradicional de cultivo da soja (RS, SC e PR). Com a expansão da soja para outros locais, a praga começou também a preocupar os agricultores dessa região, tendo sido observada em algumas lavouras dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e, em maior intensidade, no Oeste da Bahia. Em geral, os maiores ataques tem sido verificados nas regiões mais frias. Nestas, onde é feita a semeadura direta da soja sem rotação de culturas, o desenvolvimento de espécies de coleópteros é facilitado, pois passam longo período em hibernação no solo, como o tamanduá-da-soja (Hoffmann-Campo et al., 1990). Como tanto os adultos quanto às larvas podem danificar a planta, o potencial de danos é grande, principalmente quando a população é alta e ocorre na fase inicial de desenvolvimento da cultura. Nessa situação, pode haver perda total da lavoura.

Os adultos são gorgulhos de aproximadamente 8 mm de comprimento, coloração preta e listras amarelas no pronoto e nos élitros, formadas por pequenas escamas, (Hoffmann-Campo et al., 1991) Para realizar a postura, a fêmea faz um anelamento na haste principal, cortando toda a epiderme, onde deposita seus ovos. As larvas se desenvolvem no interior do caule, no local do anelamento, onde se forma uma galha que ultrapassa o seu diâmetro.

Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados na safra 2005/06, em casa-de-vegetação (temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $83 \pm 2\%$), testando-se BR 16, PI227687, PI171451, BRQ96 3065, Viçosa, BRS 134, BABR03-1211 e BABR04-682, em situação de livre-escolha (ensaio 1) e confinamento (ensaio 2). Nos dois ensaios, o delineamento foi inteiramente casualizado, com 10 repetições e a cultivar BR 16 foi utilizada como padrão de suscetibilidade. No ensaio 1, cada parcela foi constituída por uma caixa de amianto, medindo $6,4\text{m}^2$, coberta com gaiola telada contendo duas plantas de cada um dos genótipos testados. Para a realização dos experimentos, os adultos foram coletados em áreas com infestação da praga no município de Mauá, PR, sendo as infestações realizadas 40 dias após a semeadura da soja. Em cada gaiola foram colocados nove casais de *S. subsignatus*, sendo os mesmos retirados 10 dias após a infestação. No ensaio 2, cada repetição constou de um vaso de 8L, com três plantas do mesmo genótipo e coberto com gaiola telada para conter três casais, mantidos assim por oito dias. Cerca de 20 dias após a infestação, nos dois ensaios, os danos por alimentação (raspagens de 1 a 5 cm nos ramos e caule ou trifólio cortado) e as posturas foram contados.

Paralelamente, foi instalado um ensaio com os mesmos genótipos para avaliar as concentrações de flavonóides (rutina, genistina, daidzina e glicetina), assim como identificar aqueles com maior capacidade de responder ao ataque da praga, produzindo fitoalexinas (gliceolinas). Para isso, caules com e sem danos em anel foram cortados 24, 48, e 72 horas após o ataque do inseto; os caules coletados foram pesados e macerados com 5ml da solução de MeOH aquoso (80%), filtrados e secos na capela. Os extratos

obtidos foram analisados através de técnicas cromatográficas, sendo as amostras ressolubilizadas em 1ml de MeOH 80%. Uma alíquota de 20 µl foi injetado no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), para a identificação das substâncias de defesa.

Resultados e Discussão

Confirmando estudos anteriores (Oliveira & Hoffmann-Campo, 2004) o teste de livre-escolha foi mais eficiente para discriminar os genótipos. Em relação ao número de posturas, todos os genótipos foram semelhantes ao padrão (BR 16), mas a PI 171451 apresentou maior número de ovos, diferindo de BABR03-1211 e BABR04-682 (Tabela 1). Nesses dois últimos genótipos, também se observou um menor número de danos, quando comparados com o padrão ('BR 16') e aos demais genótipos. Quando se avaliou o somatório dos danos (dano total), a cultivar Viçosa foi o genótipo preferido pelo inseto e observou-se a mesma tendência, ou seja, o inseto

Tabela 1. Número de posturas e danos causados por *Sternechus subsignatus*, em diversos genótipos de soja, em situação de livre-escolha e confinamento.

Genótipo	Livre-escolha			Confinamento		
	Número por caixa			Número por vaso		
	Posturas	Danos por alimentação ¹	Dano total ² **	Posturas	Danos por alimentação ¹	Dano total ²
BR 16	0,88±0,44 ab	4,50±0,37 ab	5,25±0,65 ab	7,78±1,96	7,10±1,66	18,70±1,51
BRQ 96-3065	0,80±0,36 ab	3,30±0,47 b	4,10±0,57 bc	4,30±1,07	10,10±1,44	15,70±0,30
BRS 134	1,33±0,49 ab	4,67±0,47 ab	5,57±0,90 ab	5,44±1,59	9,20±1,32	16,89±1,43
BABR 04-682	0,30±0,30 b	2,00±0,37 c	2,30±0,60 c	—	—	—
BABR031211	0,20±0,13 b	1,90±0,23 c	2,10±0,28 c	—	—	—
PI 171 451	1,56±0,56 a	4,70±0,56 ab	6,70±0,93 a	6,80±1,68	8,90±1,21	16,80±1,92
PI 227 687	0,40±0,22 ab	4,10±0,55 ab	4,50±0,58 ab	3,30±1,12	7,90±1,57	12,80±0,84
Viçosa	1,00±0,44 ab	5,33±0,24 a	6,50±0,45 ab	7,10±1,66	6,30±1,17	15,70±1,61
Valor de F	2,80 *	10,76 **	9,74**	7,312 ns	1,010 ns	2,076 ns

¹ Dano por alimentação (raspagens de 1 a 5 cm nos ramos e/ou caule) + trifoliolo cortado + postura

² Dano total= dano por alimentação e postura+planta morta

Probabilidade de F: * 0,01; ** <0,001; ns não-significativo ou <0,05.

preferiu os demais genótipos em detrimento a BABR03-1211 e BABR04-682. Em situação de confinamento, não houve diferença significativa entre os genótipos testados.

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que os genótipos testados produziram compostos induzidos após o ataque de *S. subsignatus*, uma vez que as testemunhas não apresentaram a produção de gliceolinas, as fitoalexinas da soja. Vinte e quatro horas após a infestação já houve a produção de fitoalexinas (gliceolina), em todos os genótipos. A variedade Viçosa e a linhagem BRQ 96-3065 apresentaram resposta ao coleóptero em todos os tratamentos (48h e 72h) em todas as repetições. Devido à mortalidade das plantas, em função do ataque do inseto as PI 1711451 e PI 227687 não são apresentadas. Quanto maior foi o tempo de dano maior o pico de gliceolina. Como exemplo, na Figura 1 são apresentados os cromatogramas da cultivar Viçosa, em todos os tratamentos.

Tabela 2. Produção de fitoalexinas (gliceolinas) em diversos genótipos, de soja em caules obtidos em 24h, 48h e 72h após o dano causado por *Sternechus subsignatus*.

Genótipo	Testemunha			24 horas			48 horas			72 horas		
	1 ¹	2 ¹	3 ¹	1 ¹	2 ¹	3 ¹	1 ¹	2 ¹	3 ¹	1 ¹	2 ¹	3 ¹
BRQ 96-3065	-	-	-	+	+	0	+	+	+	+	+	+
PI 1711451	-	-	-	+	+	0	0	0	0	0	0	0
PI227687	-	-	-	+	+	0	0	0	0	0	0	0
VIÇOSA	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

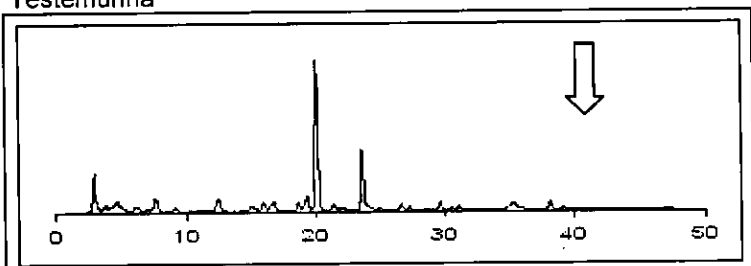
(-) Plantas que não apresentaram gliceolina

(+) Plantas que apresentam gliceolinas

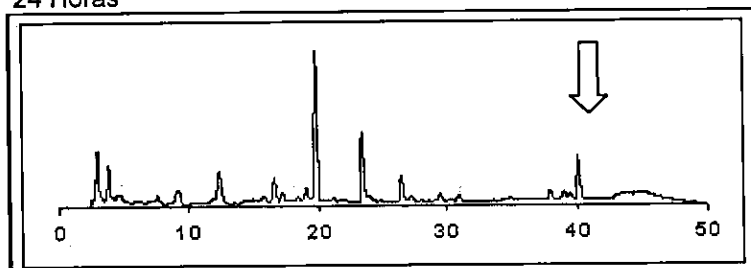
(0) Plantas danificadas e mortas pelos danos causados pela praga

¹/ Repetições: 1, 2 e 3

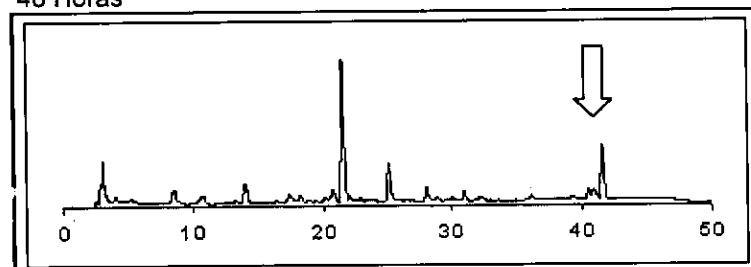
Testemunha



24 Horas



48 Horas



72 Horas

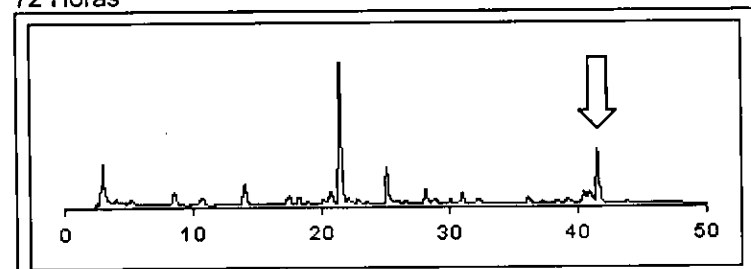


Figura. 1 Cromatogramas do cultivar Viçosa em todos os tratamentos, destacando os picos de glicolinas

Referências

- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B. de; MAZZARIN, R. M.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Níveis de infestação de *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836: Influência nos rendimentos e características agrônômicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 2, p. 221-227, fev. 1990.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA E. B. de. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 30).
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; PARRA, J. R. P.; MAZZARIN, R. M. Ciclo biológico, comportamento e distribuição estacional de *Sternechus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) em soja, norte do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 615-621, 1991.
- OLIVEIRA, L. J.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Sources of soybean resistance to *Sternechus subsignatus*. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004 Foa do Iguassu. **Abstracts of contributed papers and posters**. Londrina: Embrapa soybean, 2004. p. 292. (Embrapa Soja. Documentos, 228). Editado por Flavio Moscardi, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Odilon Ferreira Saraiva, Paulo Roberto Galerani, Francisco Carlos Krzyzanowski. Mercedes Concordia Carrão-Panizzi.
- PANIZZI, A. R.; CORREA-FERREIRA, B. S. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, v. 1, p. 71-88, 1997.

Tolerância ao *Cowpea mild mottle virus* e sua concentração relativa em soja

Tatiana Mituti¹; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida². ¹Graduanda de Biologia, Centro Universitário Filadélfia, Londrina, PR; ²Embrapa Soja, amra@cnpso.embrapa.br

Introdução

Os organismos patogênicos associados à soja, tais como fungos, bactérias e vírus, podem causar sérias perdas na produção dessa leguminosa. Nos últimos anos, surgiram vários organismos prejudiciais a esta cultura, dentre eles a podridão parda da haste, o oídio e a necrose da haste da soja (*Cowpea mild mottle virus*). Em março de 2003, em Palotina, PR, foram coletadas plantas da cv. CD 206 com intensos sintomas de necrose da haste, dos pecíolos e dos brotos, redução do porte e até morte de plantas (Almeida et al., 2002).

Através de análises biológica e molecular, foi confirmada a presença de um carlavírus semelhante àquele identificado como *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), que causa a doença denominada de Necrose da Haste da Soja (VNHS). O CPMMV tem se espalhado rapidamente para as diversas regiões produtoras de soja, no Brasil, e é transmitido por mosca branca (*Bemisia tabaci*).

O trabalho teve como objetivo verificar o nível de sintoma da planta correspondente à concentração relativa do vírus, determinada através da técnica de ELISA indireto, e a influencia da temperatura no aumento da concentração viral.

Material e Métodos

Plantas de soja das cvs. BRSMT Pintado e BRS 133, consideradas resistentes, e CD 206 e BRS 136, consideradas suscetíveis, foram inoculadas com suspensão viral, obtida a partir da maceração de tecido foliar sintomático,

na presença de tampão fosfato de potássio 0,01M, pH7, utilizando carvão vegetal finamente moído como abrasivo. Após a inoculação, as plantas foram lavadas e mantidas em casa-de-vegetação, em temperatura de 28°C. As avaliações, quanto ao nível de sintoma (1 a 4), foram feitas 20 dias após a inoculação. O mesmo experimento foi repetido em condições de baixa temperatura (média 20°C).

As folhas do trifólio imediatamente acima das folhas primárias, inoculadas, e as folhas do terceiro trifólio foram utilizadas, isoladamente, para o teste de Elisa.

O teste de ELISA indireto (Koenig, 1981) foi feito utilizando anti-soro obtido pela imunização de coelhos com preparações purificadas do CPMMV. A imunoglobulina G (IgG) foi obtida após purificação do anti-soro. A diluição da IgG foi de 1:300. O extrato vegetal foi utilizado na diluição de 1:2500. Amostras de folhas de soja sadia foram utilizadas como controle negativo. As placas foram submetidas à leitura de absorbância em 405 nm, após 40 minutos da aplicação do substrato (p-nitrofenilfosfato).

Em outro experimento, procurou-se avaliar a concentração viral da planta aos 8, 16 e 32 dias após inoculação. O folíolo central de todos os trifólios, de cada planta inoculada, foi coletado e utilizado na análise.

Resultados e Discussão

Através do teste de ELISA, o VNHS foi quantificado, e, nos primeiros trifólios obtiveram-se as absorbâncias de 0,425, 0,257, 0,092 e 0,142, nas cultivares BRSMT Pintado, BRS 133, CD 206 e BRS 136, respectivamente. Nos trifólios mais novos, a absorbância foi de 0,565, 0,454, 0,362 e 0,370, em BRSMT Pintado, BRS 133, CD 206 e BRS 136, respectivamente.

As plantas assintomáticas das cvs. BRSMT Pintado e BRS 133 possuíam maior concentração de vírus do que as plantas das cvs. suscetíveis (CD 206 e BRS 136). Assim, essas cultivares foram denominadas como tolerantes ao CPMMV. Também constatou-se que, em baixas temperaturas, o nível dos sintomas aumentou nas plantas suscetíveis e nas tolerantes. Outro fato importante observado foi a maior concentração relativa de vírus nos trifólios mais novos.

No experimento de diferentes épocas de coleta das folhas, constatou-se o início do declínio da concentração relativa de vírus aos 16 dias após a inoculação das plantas.

O vírus causador da necrose da haste da soja é transmitido pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*); no entanto, o controle do vetor é inviável. A melhor alternativa de controle é através de cultivares resistentes/tolerantes. Avaliações de campo mostraram que algumas cultivares são assintomáticas, enquanto outras apresentam recuperação. Dentre as cultivares assintomáticas, verificou-se a tolerância de BRSMT Pintado e BRS 133.

Cultivares assintomáticas não podem ser consideradas resistentes, necessitando diagnose para confirmação da presença de vírus. A concentração viral tende a diminuir nas plantas infectadas. Plantas suscetíveis não apresentaram recuperação e, entre 350 genótipos do banco ativo de germoplasma testados, nenhum foi resistente ou imune ao CPMMV.

Referências

ALMEIDA, A. M. R.; VLIET, H. van der.; KITAJIMA, E. W.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Necrose da haste: uma nova virose da soja, no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2.; MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. **Perspectivas do agronegócio da soja: resumos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 42. (Embrapa Soja. Documentos, 181). Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Clara Beatriz Hoffmann-Campo.

KOENIG, R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 55, p. 53-62, 1981.

Análise da indução do promotor *rd29A* de *Arabidopsis thaliana* em soja após déficit hídrico, através de ensaios histoquímico e fluorimétrico em plantas transformadas com a construção *rd29A:GUS*

Amanda Alves de Paiva Rolla¹; K. Yamaguchi-Shinozaki²; N. Yamanaka²; K. Nakashima²; José Renato Bouças Farias³; Silvana R. R. Marin³; C. A. Silveira³; S. M. Lügler³; M. A. Beneventi⁴; Ricardo Vilela Abdelnoor³; A. M. Polizel⁴; Alexandre Lima Nepomuceno³. ¹Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL; ²Japan International Research Center for Agriculture Sciences - JIRCAS; ³Embrapa Soja, nepo@cnpso.embrapa.br; ⁴Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Introdução

Adversidades climáticas, como o aumento de temperatura e períodos de estiagem cada vez mais freqüente tem representado um sério problema à produção agrícola em todo o mundo. No Brasil, a seca tem afetado consideravelmente a cultura de soja, promovendo perdas significativas.

A adoção de estratégias moleculares visando à obtenção de plantas com maior tolerância à seca tem sido utilizada, com sucesso, em espécies como *Arabidopsis thaliana* (Kasuga et al., 1999), trigo (Pellegrineschi, et al., 2002), tabaco (Kasuga et al., 2004) etc. Entretanto, um fator importante nestas estratégias é a utilização de construções gênicas que possuam regiões promotoras ativadas somente no momento do estresse.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência de indução do promotor *rd29A* estresse induzido obtido de *A. thaliana* em plantas de soja, após déficit hídrico.

Materiais e métodos

A indução do promotor *rd29A* foi analisada em material proveniente da

cultivar BR16, sensível a seca, transformada com a construção *rd29A::GUS* em ensaio histoquímico e fluorimétrico de acordo com Lacorte (1999).

No ensaio histoquímico o material utilizado correspondeu às plantas nomeadas P1234, P1251 e P1263A (Fig. 1). De cada planta foi coletado um folíolo, e como controle positivo, foi coletado um folíolo de uma planta transformada com a construção *35S::GUS*. Os folíolos foram divididos em oito partes correspondendo aos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos de desidratação celular em estufa a 37°C para a indução do promotor *rd29A*. Ao final de cada tempo, foi adicionado o tampão de reação X-GLUC, e a placa contendo as amostras foi incubada a temperatura de 37°C, aproximadamente 16 horas.

Para o ensaio fluorimétrico, foram coletados três folíolos da planta *rd29A::GUS* nomeada 440. Os folíolos foram novamente divididos nos tempos de desidratação celular, colocados em placa de Petri e levados a estufa a 37°C para a indução do promotor *rd29A*. Posteriormente, foi feita a

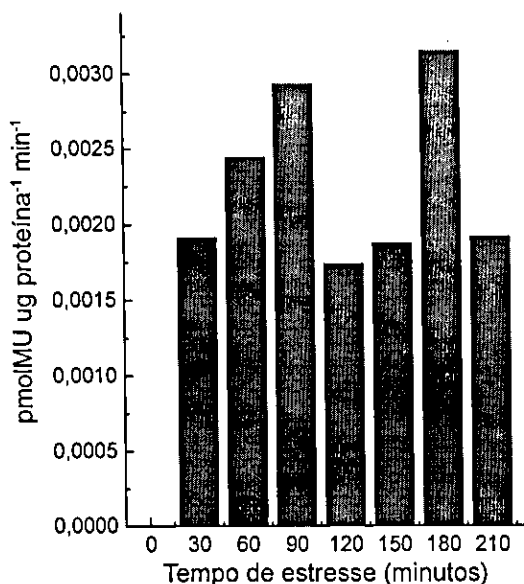


Figura 1. Atividade de GUS em folíolos da planta 440 expressa em pmolMU ug proteína⁻¹ min⁻¹ após os tempos de desidratação celular.

maceração do tecido vegetal utilizando tampão de extração. A leitura das amostras foi realizada em fluorímetro, assim como a determinação da concentração de proteína total em cada extrato e o cálculo da atividade específica de GUS.

Resultados e discussão

Através do ensaio histoquímico foi possível verificar a indução do promotor *rd29A* em tecido foliar das plantas P1234, P1251 e P1263A sob condições de desidratação celular. Diferenças de coloração entre os tempos de indução e entre as plantas também foram observadas e podem estar relacionadas ao tamanho das amostras e a idade foliar. Entretanto, número de cópias do inserto, assim como o local de inserção no genoma, podem influenciar diretamente os níveis de expressão do transgene (Reddy et al., 2003; Somers & Makarevitch, 2005).

O promotor *rd29A* foi ativado nos primeiros trinta minutos de desidratação celular e mostrou aumento crescente até noventa minutos, após esse período houve uma diminuição e a expressão máxima ocorreu em 180 minutos (Figura 1). De acordo com Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993) a indução máxima do promotor *rd29A* em *A. thaliana* ocorre em duas fases, entretanto análises mais precisas estão sendo realizadas em soja. Os resultados observados também indicam que o promotor *rd29A* de *A. thaliana* é reconhecido pelos mecanismos de percepção de déficit hídrico presentes em soja e demonstra a rápida indução do promotor *rd29A* em situações de déficit hídrico.

Considerando a complexidade do mecanismo de resposta ao déficit hídrico, o controle da expressão gênica é uma característica importante para a transferência genética quando relacionado a fatores de transcrição que controlam a expressão de uma série de genes em resposta à seca, como DREB1A. A utilização de um promotor estresse induzido como *rd29A* pode diminuir efeitos negativos promovido pelo uso de promotores constitutivos como 35S, assim como, promover a tolerância à seca permitindo o aumento no nível de expressão apenas em condições de déficit hídrico, sem redução da produtividade da cultura.

Referências

- LACORTE, C. In: Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C., (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**, Brasília-DF, Embrapa – SPI/ Embrapa-Cenargem, 1998. p. 128-141.
- KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature America Inc.** p. 287-291, 1999.
- KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, 45(3), 346-350. 2004.
- PELLEGRINESCHI, A.; RIBAUT, J.-M.; TRETHOWAN, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINTONG, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. **JIRCAS Working Report**. p. 55-60. 2002.
- REDDY, M. S. S.; DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Rep.** v. 21, p. 676-683, 2003.
- SOMERS, D. A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology** 2004, 15:126-131, 2005.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Mol Gen Genet.** v. 236, p. 331-340. 1993.

Saturação com marcadores de microssatélites dos grupos *J* e *G* nas regiões de ligação dos genes de resistência à ferrugem asiática da soja

Selma dos Santos Pereira^{1,2,5}; D. C. G. da Silva^{1,2,3*}; N. Yamanaka^{1,4}; L. M. Nogueira^{1,2}; A. L. de L. Passianotto^{1,2}; J. V. M. dos Santos; Carlos Alberto Arrabal Arias¹; Alexandre Lima Nepomuceno¹; Ricardo Vilela Abdelnoor¹. ¹Embrapa Soja, selma@cnpso.embrapa.br; ²Fundação Faculdades Luiz Meneghel - FFALM; ³Universidade Estadual Paulista, UNESP-Jaboticabal; ⁴Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS; ⁵Universidade Estadual de Londrina.

Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e um dos poucos com potencial para aumentar a produção no futuro, dado a existência de áreas ainda não cultivadas e a crescente demanda mundial por produtos de soja. Entre os problemas que afetam a produção de soja no Brasil, a ferrugem asiática, doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & Syd., tem causado enormes danos econômicos. Perdas de produtividade maiores que 75% já foram observadas quando nenhuma medida de controle da doença foi aplicada (Yorinori et al., 2005).

Até o momento, não existem cultivares de soja resistentes a ferrugem asiática e, o que torna é imprescindível a identificação e o desenvolvimento de cultivares resistentes. Quatro genes de resistência à ferrugem asiática foram descritos na literatura: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* (Hartwig e Bromfield, 1983; Hartwig, 1986). Genes de resistência também foram identificados em outros genótipos, como a FT-2, uma cultivar brasileira (Arias et al., 2004). Quando a doença foi primeiramente detectada no Brasil todos estes genes eram efetivos. Entretanto, em 2003, um isolado de *P. pachyrhizi* infectou plantas portadoras dos genes *Rpp1*, *Rpp3* e pelo locus identificado na cultivar FT-2. Atualmente, dos genes descritos na literatura, somente o *Rpp2* e o *Rpp4* permanecem efetivos (Arias et al., 2004). Em trabalho

desenvolvido na Embrapa Soja, os genes *Rpp2* e *Rpp4* foram mapeados nos grupos de ligação J e G, respectivamente (Silva et al., 2006a; Silva et al., 2006b). Entretanto, os marcadores que foram descobertos flanqueando esses genes estão a distâncias muito altas dos respectivos *loci* para serem utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM), em programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi saturar com marcadores microssatélites os grupos de ligação J e G nas regiões de localização dos genes *Rpp2* e *Rpp4*, possibilitando utilizá-los na SAM.

Materiais e Métodos

Para o mapeamento dos genes *Rpp2* e *Rpp4* foram utilizados cruzamentos entre a cultivar "BRS-184" e as PIs 230970 e 459025, respectivamente. Das plantas F_1 , foram obtidas populações segregantes $F_{2,3}$, compostas por 130 e 80 indivíduos, para o mapeamento dos genes *Rpp2* e *Rpp4*, respectivamente. Tais populações foram inoculadas com o fungo *P. pachyrhizi* e avaliadas fenotipicamente quanto à resistência, mediante a identificação de lesões RB, características de genótipos resistentes, e de lesões TAN, características de genótipos suscetíveis.

Trifólios dos genótipos parentais e dos indivíduos das populações segregantes foram submetidos à extração de DNA, amplificação de microssatélites e à análise dos fragmentos amplificados (Cervigni 2004). Inicialmente, os *primers* de microssatélites foram testados nos parentais para verificar polimorfismo. Foi utilizada a estratégia de *bulks* segregantes. Os marcadores polimórficos entre os *bulks* foram testados nas populações F_2 e a informação genotípica gerada foi cruzada com a informação fenotípica oriunda da avaliação de resistência para a confirmação da ligação.

A proporção de segregação para os marcadores e para a resistência a doença foi analisada pelo teste do χ^2 . Para a análise de ligação, o programa GQMOL.

Resultados

Para a saturação do grupo de ligação J na região de localização do gene *Rpp2* foram testados entre os parentais os *primers* Sat_366, Satt244, Satt620, Satt621, Sct_001, Sat_255 e Sat_361, dos quais foram polimórficos os *primers* Sat_366, Satt620, Sct_001, Sat_255. No grupo de ligação G na região de localização do *Rpp4*, foram testados os marcadores Sct_199, Satt472, Satt612, AF162283 e Sat_143, sendo polimórfico apenas o marcador AF162283. Não houve distorção de segregação significativa para nenhum dos loci de microssatélites, analisados de acordo com o teste do χ^2 ($P > 0,05$). A análise de ligação mapeou o locus *Rpp2* a 7,3 cM do marcador Satt255 e a 5,6 cM do marcador Satt620, no grupo de ligação J. O locus *Rpp4* foi mapeado a 1,3 cM e 12,3 cM dos microssatélites Satt288 e AF162283, respectivamente, no grupo de ligação G.

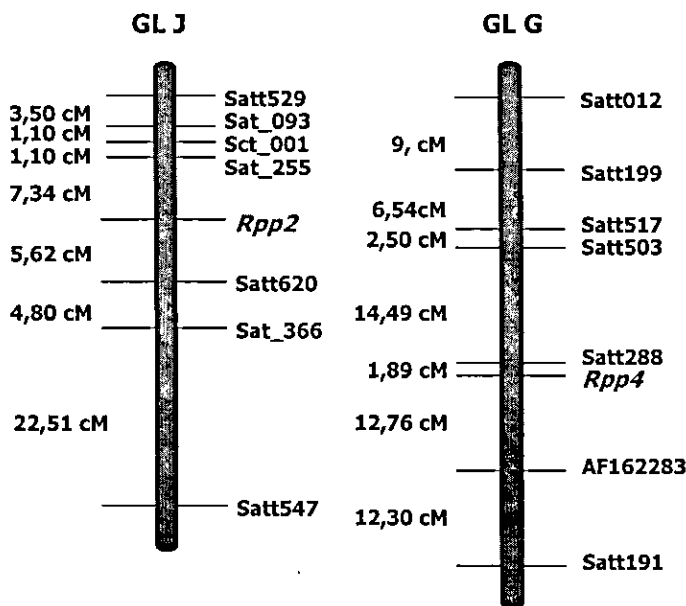


Figura 1. Mapas dos grupos de ligação (GL) J e G evidenciando as regiões de localização dos genes *Rpp2* e *Rpp4*. (lado esquerdo: distâncias em cM e lado direito: marcadores microssatélites identificados).

Considerações Finais

Os marcadores identificados neste estudo apresentaram distâncias menores dos respectivos genes de resistência do que as encontradas anteriormente, sendo estas satisfatórias para a utilização dos mesmos em programas de melhoramento. O próximo passo será a análise destas populações com outros marcadores, como RFLP, SCAR e AFLP, para a obtenção de um mapa mais saturado. Outros genes de resistência à ferrugem asiática foram recentemente identificados pela equipe de Melhoramento da Embrapa Soja os quais estão sendo mapeados. Com o mapeamento desses genes de resistência, a introdução conjunta dos mesmos em cultivares comerciais será grandemente facilitada pelo uso da SAM.

Apoio: Japan International Research Center for Agricultural Sciences-JIRCAS; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Financiadora de estudos e Projetos - FINEP e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja.

Referências

- ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L., OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO, J. F. F. 2004. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). In: F. Moscardi *et al.* (Ed.), Abstracts of Contributed Papers and Posters, VII World Soybean Research Conference, Embrapa Soybean, Londrina, p. 100.
- CERVIGNI, G. D. L.; SCHUSTER, I.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. 2004. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. *Euphytica* 135, 99-105.
- HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R., 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science* 23: 237-239.
- HARTWIG, E. E., 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science* 26: 1135-1136.
- SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO,

A. L.; PEREIRA, S. dos S.; ABDELNOOR, R. V. Mapeamento do gene *Rpp4* que confere resistência à ferrugem asiática da soja. In: IV Congresso Brasileiro de Soja. Documentos - Embrapa p. 45. 2006a.

SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L.; PEREIRA, S. dos S.; ABDELNOOR, R. V. Mapeamento do gene *Rpp2* que confere resistência à ferrugem asiática da soja. In: IV Congresso Brasileiro de Soja. Documentos - Embrapa p. 45. 2006b.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. J., 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Disease 89: 75-677.

Resistência à ferrugem asiática da soja em genótipos do Japão e do Nordeste da China

André Luiz de Lima Passianotto^{1,2}; L. M. Nogueira^{1,2}; D. C. G. da Silva^{1,2,3}; Ricardo Vilela Abdelnoor²; Alexandre Lima Nepomuceno²; N. Yamanaka^{2,4}. ¹Fundação Faculdades Luiz Meneghel - FFALM, Bandeirantes, PR, andre@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja; ³Universidade Estadual Paulista, UNESP-Jaboticabal; ⁴Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS.

Introdução

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, é atualmente a doença mais devastadora que afeta a produção de soja em regiões tropicais e subtropicais (AVRDC, 1992). Desde seu aparecimento no Brasil, em 2001, esta doença tem causado sérias reduções nos rendimentos da cultura. Perdas de produtividade maiores que 75% já foram observadas quando nenhuma medida de controle da doença foi aplicada (Yorinori et al., 2005).

Até o momento, não existem cultivares resistentes a ferrugem asiática no Brasil e o único método de controle da doença é a aplicação de fungicidas, os quais são nocivos ao meio ambiente e oneram substancialmente a produção. Portanto, é imprescindível a identificação de materiais e o desenvolvimento de variedades resistentes. Quatro genes de resistência à ferrugem asiática foram descritos na literatura: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* (Bromfield e Hartwig 1980, Mclean e Bith 1980, Hartwig e Bromfield 1983, Hartwig 1986). Genes de resistência também foram identificados em cultivares brasileiras, como a FT-2 (Arias et al., 2004). Quando a doença foi primeiramente detectada no Brasil todos estes genes eram efetivos. Entretanto, em 2003, uma nova raça de *P. pachyrhizi* quebrou a resistência conferida pelos genes *Rpp1*, *Rpp3* e pelo locus da cultivar FT-2.

A alta variabilidade genética do fungo causador da doença e a tendência de quebra rápida de resistência são as principais causas da atual necessidade de se encontrar novas fontes de resistência ou tolerância. Estudos

moleculares prévios mostraram que genótipos originados do Japão e do nordeste da China apresentam alta diversidade genética entre si e uma relação distante com genótipos brasileiros (Yamanaka et al., 2005). Assim, esses materiais poderiam contribuir para aumentar a variabilidade genética da soja no Brasil. O objetivo deste estudo foi identificar fontes de resistência ou tolerância à ferrugem asiática entre genótipos de soja (*Glycine max*) de origem japonesa e chinesa.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná, de novembro de 2005 a maio de 2006. Foram avaliadas de 5 a 16 repetições de 225 variedades provenientes do Nordeste da China, 38 variedades japonesas e 5 variedades de resposta conhecida a ferrugem asiática, para serem utilizadas como padrão de resistência e suscetibilidade: a cultivar suscetível BRS154 e as variedades portadoras de genes de resistência PI200492 (*Rpp1*), PI230970 (*Rpp2*), PI462312-Ankur (*Rpp3*) e PI459025 (*Rpp4*). Os genótipos chineses foram previamente caracterizados quanto a 20 características importantes como peso de 100 grãos, teor de proteína e lipídios, período de florescimento e maturação, resistência a doenças e insetos, entre outros (Yamanaka e Okabe, 2005).

As sementes foram germinadas em câmara de germinação e transplantadas para vasos plásticos em casa de vegetação. A inoculação foi realizada em estágio V4 mediante a aplicação de uma suspensão de esporos em água + 0,5% de *tween20*, em uma concentração de 105.000 esporos/mL. Dezenove dias após a inoculação as plantas foram avaliadas quanto a: coloração das lesões, sendo a coloração castanho-clara (do inglês *light tan* ou TAN), característica de genótipos suscetíveis, e a coloração marrom-avermelhada (do inglês *reddish-brown* ou RB), características de genótipos resistentes; percentual de esporulação analisado através de uma tabela diagramática (Godoy, 2005); grau de esporulação, sendo os genótipos classificados como portadores de nenhuma, pouca ou muita esporulação, e; presença ou ausência de amarelecimento precoce e abscisão foliar. Para confirmar os resultados desta avaliação, um segundo experimento foi montado em câmara de crescimento utilizando as sementes dos genótipos avaliados

no primeiro experimento e classificados como resistentes ou tolerantes. Os mesmos critérios e procedimentos adotados no primeiro experimento foram utilizados no segundo.

Resultados

Os resultados do primeiro experimento mostraram que nenhum dos 263 genótipos apresentou imunidade ou fenótipo com lesões RB sem formação de esporos e urédia (Tabela 1). Entretanto, foram identificados seis genótipos chineses e um japonês que apresentaram lesões RB com formação de esporos e urédia e dois genótipos chineses que apresentaram lesões TAN, mas não tiveram amarelecimento precoce e abscisão prematura de folhas devido à doença (Tabela 1). Os outros 254 genótipos foram suscetíveis à ferrugem, apresentando os sintomas típicos da doença e lesões tipo TAN (Tabela 1). No segundo experimento, algumas das variedades não puderam ser avaliadas por dificuldade de germinação e indisponibilidade de sementes. Os resultados da avaliação do primeiro experimento foram confirmados em relação à coloração de lesões para todas as variedades, exceto a QingDou (Tabela 2). Em relação à quantidade de lesões e ao grau de esporulação, houve diferenças entre o primeiro e o segundo experimento para todas as variedades avaliadas (Tabela 2). Tais diferenças podem ser certamente atribuídas a diferenças de pressão de inóculo entre os dois experimentos. Em relação ao amarelecimento precoce e abscisão

Tabela 1. Reação de 38 variedades japonesas e 225 variedades chinesas ao fungo *P. pachyrhizi*.

Categoria	Nº de variedades	
	Japão	China
Ausência de lesões (reação imune)	0	0
Presença de lesões RB, sem urédias e esporulação	0	0
Presença de lesões RB, com urédias e esporulação	1	6
Presença de lesões TAN, sem amarelamento e abscisão foliar	0	2
Presença de lesões TAN, com amarelamento e abscisão foliar	37	217
Total	38	225

Tabela 2. Resultados das avaliações de lesões foliares causadas por infecção com ferrugem asiática da soja em variedades do Japão e nordeste da China. Estão apresentados nesta tabela apenas os resultados das avaliações dos genótipos que se apresentaram resistentes ou tolerantes na primeira avaliação e dos genótipos utilizados como padrão de resistência e suscetibilidade.

Genótipo	Origem	1ª Avaliação de lesões			2ª Avaliação de lesões			Caráter		
		Cor	Quantidade	Esporulação	APAF	Cor	Quantidade		Esporulação	APAF
XiaoJinHuang	NEC	RB	2%	Pouca	o	RB	2%	Pouca	o	Res
NiuMaoHuang	NEC	RB	2%	Nenhuma	o	RB	18%	Muita	o	Res
QingDou	NEC	RB	18%	Muita	o	TAN	2%	Média	o	Res
DaBaiQi	NEC	RB	2%	Pouca	o	RB	7%	Muita	o	Res
6611	NEC	RB	2%	Pouca	o	RB	2%	Muita	o	Res
Himeshirazu	JP	RB	2%	Pouca	o	RB	2%	Muita	o	Res
LuPiDou	NEC	TAN	2%	Muita	x	TAN	2%	Média	x	Ptol
HeiDou	NEC	TAN	2%	Muita	x	TAN	7%	Muita	x	Ptol
DaLiZi	NEC	RB	18%	Nenhuma	o	RB	7%	Pouca	o	Res
PI200492 (Rpp1)		TAN	2%	Pouca	o	I		I	I	Sus
PI230970 (Rpp2)		RB	2%	Pouca	o	RB	2%	Pouca	o	Res
PI462312 (Rpp3)		TAN	2%	Pouca	o	I		I	I	Sus
PI459025 (Rpp4)		RB	7%	Pouca	o	RB	2%	Nenhuma	o	Res
BRS154	BR	TAN	2%	Pouca	o	TAN	2%	Muita	o	Sus

APAF: Amarelecimento precoce e abscisão foliar; NEC: Nordeste da China; JP: Japão; RB: Brasil; o - presença; x - ausência; I - não foi possível avaliar; Res: resistente; Ptol: possível tolerante; Sus: suscetível

foliar prematura, foram confirmados todos os resultados (Tabela 2). Entre as variedades classificadas como resistentes e tolerantes foi possível identificar duas que foram mais promissoras: a DaLiZi, por apresentar lesões RB de baixa esporulação e a LuPiDou por apresentar poucas lesões TAN de moderada a alta esporulação sem contudo amarelecimento precoce e abscisão foliar prematura. Estes resultados indicam que tais variedades poderão ser importantes fontes de resistência vertical e tolerância, respectivamente. Entretanto, para confirmar o potencial de tolerância apresentado pela LuPiDou, avaliações de produtividade com e sem a aplicação de fungicidas em situação de infecção com ferrugem asiática deverão ser realizadas.

Conclusão

A maioria dos genótipos selecionados para avaliação foram caracterizados como suscetíveis para *Phakopsora pachyrhizi*. Entretanto, foram encontrados materiais importantes sob o ponto de vista de seu potencial como fonte de resistência ou tolerância. Espera-se que estes genótipos ajudem a aumentar a variabilidade genética existente nas cultivares brasileiras mediante sua utilização em programas de melhoramento.

Referências

Asian Vegetable Research and Development Center, 1992. Annotated bibliography of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). AVRDC (Asian Veg. Res. Dev. Cent.) Library Bibliography Series 4-1. Publication No. 92-372.

ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; YORINORI, J. T.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. F.; TOLEDO, J. F. F., 2004. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). In: F. Moscardi et al. (Ed.), Abstracts of Contributed Papers and Posters, VII World Soybean Research Conference, Embrapa Soybean, Londrina, p. 100.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E., 1980. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. Crop Science 20: 254-255.

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31: 063-068.2006.

HARTWIG, E. E., 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science* 26: 1135-1136.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R., 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science* 23: 237-239.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D., 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* 31: 951-956.

YAMANAKA, N.; SATO, H.; YANG, Z.; XU, D. H.; CATELLI, L. L.; ARIAS, C. A. A.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L., 2005. Genetic relationship of three soybean germplasms revealed by SSR markers. 51º Congresso Brasileiro de Genética, pp 595.

YAMANAKA, N.; OKABE, A., 2005. Evaluation and utilization of soybean genetic resources in Northeast China and development of novel soybean breeding materials using new technology. JIRCAS Working Report 42: 77-87

YORINORI, J. T, PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. J., 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease* 89: 75-677.

Estudos preliminares relacionados ao metabolismo de resistência e tolerância à ferrugem asiática da soja

Lívia Maria Nogueira^{1,2*}; Clara Beatriz Hoffmann-Campo¹; André Luiz de Lima Passianotto^{1,2}; J. P. da Graça^{1,2}; M. Z. Abrão^{1,5}; S. dos S. Pereira^{1,2}; D. C. G. da Silva^{1,2,3}; Alexandre Lima Nepomuceno¹; Ricardo Vilela Abdelnoor¹; N. Yamanaka^{1,4}.

¹Embrapa Soja, livia@cnpso.embrapa.br; ²Fundação Faculdades Luiz Meneghel - FFALM; ³Universidade Estadual Paulista, UNESP-Jaboticabal; ⁴Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS; ⁵Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL.

Introdução

A maioria das plantas selvagens e cultivadas produz metabólitos secundários constitutivos ou induzidos por estresses externos que atuam na sua defesa contra pragas. As substâncias constitutivas fazem parte da estrutura da planta, enquanto as induzidas, denominadas fitoalexinas, são produzidas após ser elicitadas por agentes estressantes externos. Essas substâncias são primariamente fungitóxicas, podendo afetar negativamente outros organismos como os nematóides e os insetos. Em soja, as fitoalexinas mais comuns são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos isoflavonóides.

Os isoflavonóides são comuns em leguminosas sendo as isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína e seus glicosídeos os mais frequentemente em soja. As concentrações de genisteína e daidzeína foram marcadamente diferentes quando se comparam cultivares de soja (Carrão-Panizzi et al., 1999). Esses compostos são primariamente constitutivos, mas depois de serem danificadas por percevejos, observou aumento significativo de sua produção em vagens imaturas (Piubelli et al., 2003). Isoflavonóides com característica de fitoalexinas são relativamente comuns em soja, sendo as gliceolinas (pterocarpanos) e o coumestrol (coumestrans) os mais citados, principalmente em relação à proteção da planta. Após o ataque de nema-

tóides de cisto (*Heterodera glycines*) em raízes (Huang e Baker, 1991) e da falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*) em folhas de soja (Liu et al., 1992), observou-se a produção de gliceolinas, que foi maior nas cultivares resistentes do que nas susceptíveis. O composto fenólico denominado ácido salicílico tem sido citado como fator importante na indução de resistência a viroses e bacterioses (Nawrath et al., 2006). O objetivo deste trabalho foi identificar compostos químicos induzíveis por estresses causados pela ferrugem asiática em seu estágio infeccioso, comparando genótipos resistentes, tolerantes e suscetíveis submetidos ou não à doença.

Materiais e Métodos

Nos testes, utilizaram dois genótipos de soja, PI 230970 e PI 459025, que possuem genes de resistência à ferrugem asiática; uma cultivar considerada tolerante, BRS 231, e uma suscetível à doença, BRS184. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento (24°C, fotofase=12h) e 21 dias após a semeadura, quando se encontravam no estágio V3-V4 de crescimento, foram inoculadas com esporos de ferrugem, contendo 24.000 esporos/mL em solução de água + espalhante adesivo *tween*, foi pulverizada sobre as plantas. Nas testemunhas, foi aplicado apenas água + *tween*. A última folha completamente expandida de cada genótipo foi retirada a um e cinco dias após a aplicação de fungo ou água. Foram resfriadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, para posterior análise. A confirmação da infecção por ferrugem foi realizada três semanas após a inoculação. A caracterização dos genótipos, os tratamentos e o estágio de desenvolvimento da soja quando se realizou a infecção e no momento da coleta das folhas para análise são apresentados na Tabela 1.

Para a realização das análises cromatográficas, os folíolos foram descongelados, moídos e pesados, sendo uma alíquota de 500 mg submetida à extração com 90% de metanol (MeOH) em água, o extrato obtido mantido em ultra-som por 20 minutos, filtrado e seco sob fluxo de nitrogênio gasoso. Cada amostra seca foi re-solubilizada em 1mL de MeOH 80% e filtrado, utilizando filtro de seringa "Acrodisc"; 20µL dessa solução foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência - HPLC (Shimazu, Model SPD-M10A VP) equipado uma coluna específica para análises de flavonóides

Tabela 1. Caracterização dos genótipos, tratamentos e o estágio de desenvolvimento da soja no momento da infecção e da coleta das folhas para análise.

Genótipo	Reação à ferrugem	Tratamento	Estágio de desenvolvimento na inoculação	Estágio de desenvolvimento*
PI230970	Resistente <i>Rpp2</i>	C/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V3(5dai)
		S/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V4(5dai)
PI459025	Resistente <i>Rpp4</i>	C/ esporos	V3	V3(1dai)-V3(5dai)
		S/ esporos	V3	V3(1dai)-V3(5dai)
BRS231	Tolerante	C/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V4(5dai)
		S/ esporos	V3-V4	V3(1dai)-V4(5dai)
BRS184	Suscetível	C/ esporos	V4	V3(1dai)-V4(5dai)
		S/ esporos	V4	V3(1dai)-V4(5dai)

* Estágio das amostras coletadas (últimas folhas adultas abertas). dai: dia após inoculação

(fase reversa do grupo octadesil: CLS-ODS-C18-M). O fluxo do solvente foi de 1 mL/min e a absorbância do espectro foi medida a 260nm e 280nm. Os compostos foram eluídos em um sistema de gradiente linear composto por 2% de ácido acético (HOAc, solvente A), e da mistura de MeOH: HOAc: água (18:1:1, solvente B). Padrões das isoflavonas conjugadas genisteína, daidzeína e gliciteína (glucosil, malonil e acetil) e as respectivas agliconas foram também injetadas, assim como o padrão de ácido salicílico e a mistura dos três isômeros mais comuns das gliceolinas.

Resultados e Discussão

Nos cromatogramas, não foram detectadas grandes diferenças entre os tratamentos. O ácido salicílico que está relacionado à resistência sistêmica adquirida (SAR) não foi detectado em nenhum dos extratos. Porém, o flavonol canferol e seus glicosídeos foram detectados em todos cultivares e todos os tratamentos. Glicosídeos baseados em quercitina também foram detectados em todas as cultivares e tratamentos, incluindo BRS 184. Entretanto, essa substância não foi observada nos quatro tratamentos de BRS 231. Os flavonóides, incluindo as gliceolinas, não apresentaram nenhuma relação nem com a resistência das Pis 230970 e 459025 ou com a

tolerância à ferrugem da cultivar BRS 231, por si mesmos, nem tampouco pelos estádios antecipados de desenvolvimento da ferrugem da soja.

Uma substância desconhecida, com espectro típico de flavona e com tempo de retenção entre 36 a 37min, foi detectada nos extratos de BRS 231 e da PI 459025 (um dia-água, um dia-ferrugem e cinco dias-água). Essa substância, entretanto, não foi observada nos extratos dos outros genótipos (BRS 184 e PI 230970), parecendo não estar relacionada com a ferrugem da soja. Por outro lado, malonil genisteína, considerado um dos metabólitos intermediário das gliceolinas, foi observado nos quatro tratamentos em um pico bem resolvido na PI 459025, ou co-eluído com o flavonol canferol na cultivar BR 184. Os demais tratamentos não apresentaram esse composto. A produção dessa substância parece não ter sido induzida e nem estar relacionada à resistência à ferrugem. Ainda, não foi possível observar nenhuma relação da ocorrência de malonil genisteína com gliceolinas. Esta possui três isoformas (gliceolina I, III e IV), todas analisadas neste estudo. A gliceolina IV não foi detectada, mas as isoformas I e III foram detectadas em pequena quantidade, na maioria das amostras. A gliceolina I foi detectada na linhagem PI 230970 (com gene *Rpp2*) no tratamento um dia após a inoculação, na PI 459025 (com gene *Rpp4*), também no tratamento um dia após a inoculação, e na BRS 184 (suscetível), no tratamento cinco dias após a inoculação. Não se observou gliceolina I em nenhum tratamento sem inoculação (água) e na BRS 231 (tolerante). Observou-se que esse flavonóide foi produzido de maneira diferente pelos genótipos resistentes à ferrugem asiática (PI 230970 e PI 459025) que possuem genes mais eficazes contra a ferrugem da soja no Brasil. A produção de gliceolina I, logo após a inoculação desses genótipos, indica que a sua produção pode ter sido induzida pela infecção pelo fungo. Com base nesses resultados, é possível que: (i) a reação mediada pela gliceolina I, nas duas cultivares resistentes, ocorre mais rapidamente do que na suscetível; (ii) a infecção na cultivar tolerante ocorre mais tardiamente, comparada com cultivares resistentes ou suscetíveis, sendo possivelmente essa a razão da BRS 231 não produzir gliceolina I.

A produção de gliocelina II foi também em quantidade muito pequena, sendo detectada nos quatro tratamentos e em todas as cultivares. Entretanto, observou-se que as diferenças na produção entre os genótipos e nos

estádios de desenvolvimento foram menos relacionadas à resistência à ferrugem, uma vez que essa também foi observada nos tratamentos não inoculados.

Devido à agressividade da ferrugem asiática, esperava-se que os flavonóide fitoalexinas pudessem ser induzidos pela doença em seus estádios de desenvolvimento mais precoces e que fossem produzidos unicamente em genótipos resistentes. Entretanto, isto não ocorreu e, para elucidar completamente o sistema de resistência contra a ferrugem da soja, estudos adicionais precisam ser realizados, principalmente no que se refere ao tempo de resposta das plantas à inoculação com o fungo causador da ferrugem asiática.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro através do orçamento do Presidente do Jircas (Japan International Research Center for Agricultural Sciences).

Referências

- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetic and environment on isoflavone contents of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, 1999. 1787p -1795 p.
- HUANG, J-H.; BARKER, K. R. Glyceollin I in Soybean-Cyst Nematode Interactions: Spatial and Temporal Distribution in Roots of Resistant and Susceptible Soybeans. *Plant Physiology* 96, 1991. 1302p–1307 p.
- LIU, S.; NORRIS, D. M.; HARTWIG, E. E.; XU, M. Inducible Phytoalexins in Juvenile Soybean Genotypes Predict Soybean Looper Resistance in the Fully Developed Plants. *Plant Physiology* 100, 1992. 1479p-1485p.
- NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J-P.; GENOUD, T. Chemical signals in plant resistance: salicylic acid. In: S. TUZUN and E. BENT (Ed.) *Multigenic and induced systemic resistance in plants*, Springer, New York, 2006. 143p-165p.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C. de;
FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. Journal of Chemical Ecology 29, 2003. 1199p-1208p.

Análise quantitativa da expressão do gene *GmHSP 17.6-L* em linhagens de soja resistentes e suscetíveis ao nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*

Renata Fuganti^{1,2}; M. F. P. da S. Machado¹; A. M. R. Morales^{2,3}; S. R. R. Marin²; Waldir Pereira Dias²; João Flávio Veloso Silva²; Carlos Alberto Arrabal Arias²; José Renato Bouças Farias²; Alexandre Lima Nepomuceno². ¹UEM - Universidade Estadual de Maringá, rfuganti@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja; ³UNESP/FCAV - Jaboticabal.

Introdução

A produção mundial de soja cresceu, de 1970 a 2003, cerca de 333%, passando de 43,7 para 189,2 milhões de toneladas. Em 2004, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de soja, atrás dos EUA, e à frente da Argentina, com uma produção de 50 milhões de toneladas ou 25% da safra mundial, estimada em 216 milhões de toneladas (Conab, 2005; Embrapa, 2006).

No entanto, alguns fatores diminuem a produtividade da cultura, destacando-se as doenças causadas pelos nematóides fitoparasitas, em especial os nematóides de galhas, do gênero *Meloidogyne*. Os prejuízos anuais na produção mundial causados por estes patógenos são estimados em 11% devido à redução da quantidade de grãos colhidos e o aumento dos gastos com medidas de controle e defensivos agrícolas (Barker, 1998).

No entanto, o método de controle mais eficiente, prático e economicamente viável ao produtor é o uso de cultivares resistentes (Ferraz, 2001). Assim, trabalhos de pesquisas visando identificar genes expressos durante a relação parasitária de nematóides e a seleção de genes de resistência a *M. javanica* são desejáveis para aprimoramento e obtenção de genótipos resistentes a estes fitopatógenos, sendo esta uma das principais metas dos programas de melhoramento.

Em trabalhos anteriores uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular com provável função de chaperona molecular foi identificada em genótipos de soja resistentes e suscetíveis ao *M. javanica*. O sequenciamento da região promotora do gene *Gmhsp 17.6-L* (nº de acesso no *Genbank* M11317) em materiais resistentes e suscetíveis apresentou diferenças, onde uma maior inserção de repetições AT(n) foi observada nos indivíduos resistentes (Fuganti et al., 2004). Um ensaio de proteção de ribonuclease foi feito visando determinar se a inserção/deleção estaria causando inativação gênica em um dos genótipos. No entanto, foi observado que ambos genótipos apresentam expressão do gene *Gmhsp17.6-L* em tratamentos inoculado e não inoculado com o fitoparasita.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente a expressão do gene *Gmhsp17.6-L*, visando identificar se o tamanho da inserção poderia estar alterando os níveis de expressão da proteína e isto estar relacionado com a resistência/suscetibilidade ao nematóide.

Materiais e Métodos

Utilizando a técnica de PCR em tempo real, linhagens de soja resistentes (genótipo PI595099) e suscetíveis (cultivar BRS133) ao nematóide de galhas *M. javanica*, e uma amostra de indivíduos resistentes (JF7002, JF7027 e JF7056) e suscetíveis (256-S, 259-S e 266-S) resultante deste cruzamento foram analisados quanto à expressão do gene *Gmhsp 17.6-L*. As sementes foram colocadas para germinar em câmara de germinação e após 7 dias as plântulas foram transferidas para casa de vegetação. Em tubetes de plástico, os materiais foram inoculados com juvenis do nematóide, na concentração de aproximadamente 650 J₂ por planta.

As coletas de material biológico foram feitas após 1, 3 e 6 dias de inoculação. Raízes das plantas nos tratamentos inoculado e não inoculado de todos os materiais foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. RNA total foi extraído, utilizando o reagente Trizol conforme instruções do fabricante. Em seguida foi feita a síntese de cDNA, para a análise de PCR em tempo real, utilizando primers oligodT. Para confirmação da presença do nematóide, amostras de raízes foram coradas com fucsina ácida, observadas em lupa e fotografadas.

Uma curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA visando determinar a concentração ideal para o PCR em tempo real. As reações de PCR para quantificação relativa foram preparadas em triplicatas utilizando um bulk de cDNAs dos três dias de coleta de raízes nos tratamentos inoculado e não inoculado, para as diferentes amostras testadas. O gene rRNA 18S (nº de acesso no Genbank XO2623.1) foi utilizado como controle endógeno. Todas as análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se o software SDS (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA). Para análise dos parentais, a expressão do parental resistente PI595099 não inoculado, (valor 1) foi utilizado como calibrador e para a análise da população o calibrador utilizado foi a amostra resistente JF7056 não inoculado (valor 1).

Resultados e Discussão

A coloração das raízes com fuscina ácida comprovou que a inoculação com o J₂ do nematóide *Meloidogyne javanica* foi eficiente, pois em todos os materiais inoculados a presença do nematóide foi observada, tanto nos parentais como nos indivíduos da população.

Os resultados demonstram que comparando-se as amostras resistentes e suscetíveis, o gene possui maior expressão nos genótipos resistentes inoculados, tanto para os parentais (Gráfico 1) como para a população (Gráfico 2).

Estes resultados sugerem, portanto, que a presença das repetições AT(n) na região promotora do gene *Gmhsp17.6-L* pode de alguma forma favorecer uma maior expressão desta proteína na presença do nematóide e uma vez que chaperonas moleculares participam de processos celulares que promovem a proteção da célula em situações de estresse, este mecanismo pode estar relacionado com a maior/ menor resistência a nematóides.

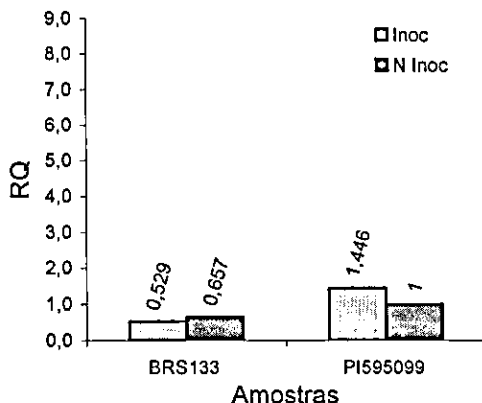


Gráfico 1. Quantificação relativa do gene *Gmhsp 17.6-L* para os parentais suscetível, BRS133 e resistente, PI595099, nos tratamentos inoculado e não inoculado com juvenis do nematóide *M. javanica*. O cDNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coletas após a inoculação com juvenis do nematóide.

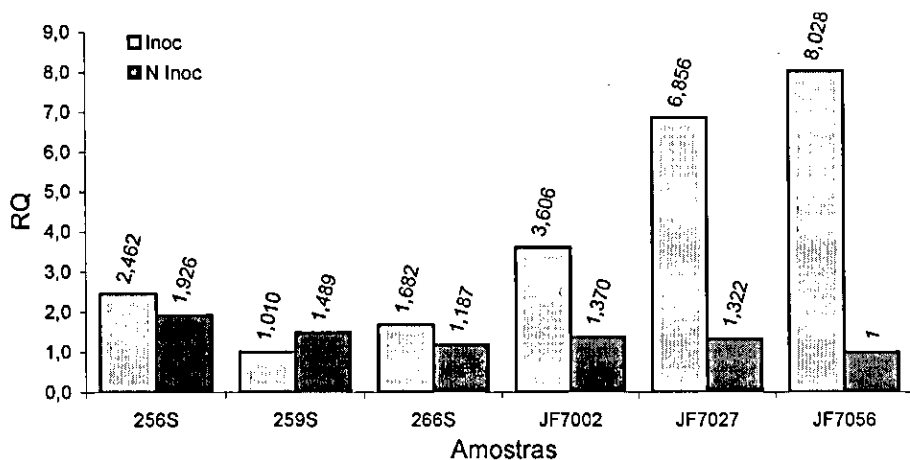


Gráfico 2. Quantificação relativa do gene *Gmhsp 17.6-L* para os indivíduos suscetíveis (256S, 259S e 266S) e indivíduos resistentes (JF7002, JF7027 e JF7056), da população resultante do cruzamento BRS133 x PI595099, nos tratamentos inoculado e não inoculado com juvenis do nematóide *M. javanica*. O cDNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coletas após a inoculação com juvenis do nematóide.

Referências

BARKER, K. R. Introduction. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A. e WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, p. 1-20, 1998.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível no site <www.conab.gov.br> 2005.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br> 2006. Acesso em julho de 2006.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 127 p, 2001.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Microsatellite insertion in a heat shock protein promoter region (Gmhsp 17.6-L) in soybean plants resistant and susceptible to *Meloidogyne javanica*. In: **VII World Soybean Research Conference - IV International Soybean Processing and Utilization Conference- III Brazilian Soybean Congress, 2004, Foz do Iguaçu- PR. Proceedings of VII World Soybean Research Conference - IV International Soybean Processing and Utilization Conference- III Brazilian Soybean Congress, 2004.**

Quantificação relativa da expressão do gene xiloglucana endotransglicosilase em linhagens de soja resistentes e suscetíveis à *Meloidogyne javanica*

Aguida Maria Rodrigues Morales^{1,2}; E. G. M. Lemos¹; Renata Fuganti^{2,3}; L. C. Alves¹; S. R. R. Marin²; João Flávio Veloso Silva²; Waldir Pereira Dias²; Carlos Alberto Arrabal Arias²; José Renato Bouças Farias²; Alexandre Lima Nepomuceno².

¹Universidade Estadual Paulista UNESP/FCAV - Jaboticabal, aguida@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja; ³Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Introdução

O consumo mundial de soja e seus derivados têm crescido a um ritmo médio anual de cinco milhões de toneladas. A produção mundial de soja na safra 2004/2005 chegou a 213,2 milhões de toneladas (Embrapa, 2006). Neste cenário os EUA disparam em volume e continuam no topo do *ranking* com 85,02 milhões de toneladas. O Brasil ostenta a privilegiada posição de segundo maior produtor de soja, com 51,09 milhões de toneladas, cerca de 28% do total mundial.

Estima-se que, aproximadamente 10 milhões de toneladas da safra brasileira de 2004 tenham sido perdidas devido a fatores abióticos e bióticos (Conab, 2005) e dentre estes estão as doenças causadas por nematóides fitoparasitos. A obtenção de maiores rendimentos com menores riscos na produção da soja, devido a perdas ocasionadas por nematóides, demonstram a urgência da necessidade de se tentar amenizar esse problema através de tecnologias mais aprimoradas (Ferraz, 2001).

Em resultados preliminares de análise de microarranjos de DNA, utilizando uma biblioteca de cDNA com materiais inoculados com o nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*, o gene que codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase (XET) (nº de acesso no *GenBank* AI495154) foi diferencialmente expresso no parental resistente inoculado. Esta enzima está envolvida no processo de espessamento da parede celular que ocorre

em determinadas plantas submetidas a estresses tais como o ataque de nematóides e tem sido relatada na literatura como sendo um mecanismo de defesa, sendo por esta razão escolhida para o estudo de PCR em tempo real.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão do gene que codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase (XET) em diferentes linhagens de soja resistentes e suscetíveis utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR).

Material e Métodos

Sementes de linhagens parentais de soja resistentes (genótipo PI595099) e suscetíveis (cultivar BRS133) ao nematóide *Meloidogyne javanica* e sementes de indivíduos resistentes (JF7002 JF7027 e JF7056) e suscetíveis (256-S, 259-S e 266-S) resultantes do cruzamento entre estes parentais foram colocadas para germinar em câmara de germinação. Após 7 dias as plântulas foram transferidas para tubetes contendo areia na casa de vegetação e em seguida, foram inoculadas com uma suspensão contendo 1200 juvenis (J2) do nematóide por planta. Raízes de todos os materiais foram coletadas nos tratamentos de um, três e seis dias após a inoculação e armazenadas a -80°C . Para confirmação da presença do nematóide, amostras de raízes foram coradas com fucsina ácida, observadas em lupa e fotografadas.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi feita a síntese de cDNA, utilizando primers oligoDT.

Uma curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA, para se determinar a concentração ideal a ser utilizada nas análises. As reações de PCR foram preparadas em triplicatas, e um controle endógeno, o gene rRNA 18S (nº de acesso no *Genbank* XO2623.1) também foi incluído. A quantificação relativa foi realizada primeiramente com os parentais utilizando bulks de cDNA das três datas de coleta nos tratamentos inoculados e não inoculados com o nematóide resultando em quatro bulks. Posteriormente, a quantificação relativa foi feita em indivíduos da

população, resultando em seis amostras resistentes: JF7002 inoculado e não inoculado, JF7027 inoculado e não inoculado, JF7056 inoculado e não inoculado, e seis amostras suscetíveis: 256-S inoculado e não inoculado, 259-S inoculado e não inoculado 266-S inoculado e não inoculado. Todas as análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se o software SDS (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

Resultados e Conclusões

A coloração das raízes com fuscina ácida comprovou que a inoculação com o J2 do nematóide *Meloidogyne javanica* foi eficiente, pois em todos os materiais inoculados a presença do nematóide foi observada, tanto nos parentais como nos indivíduos da população.

A quantificação relativa da expressão do gene XET nos parentais indicou que ele se expressava em todos os materiais, porém em diferentes níveis (Gráfico 1).

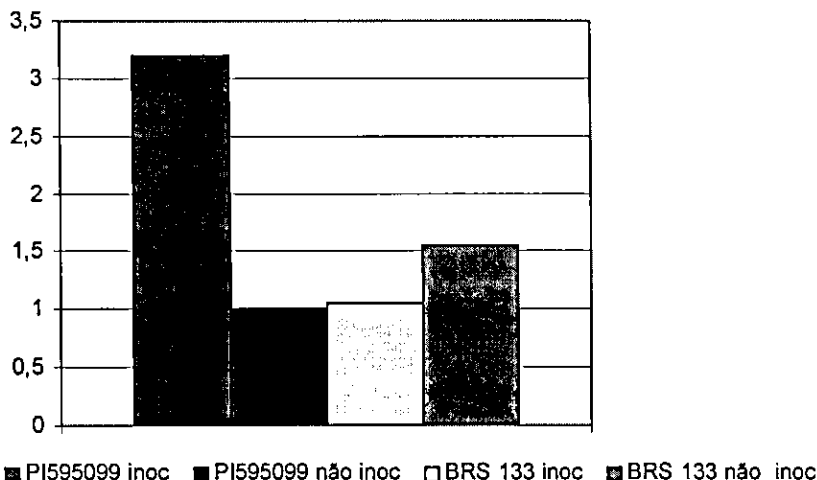


Gráfico 1. Gráfico mostrando o parental resistente PI595099 não inoculado, utilizado como calibrador (valor 1) e a expressão do gene da XET, no parental resistente PI595099 inoculado, parental suscetível BRS133 inoculado e não inoculado. O cDNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coletas após a inoculação com juvenis do nematóide.

Como os níveis de expressão no material resistente inoculado foram superiores aos outros materiais, uma quantificação relativa deste gene nos indivíduos da população também foi realizada (Gráfico 2).

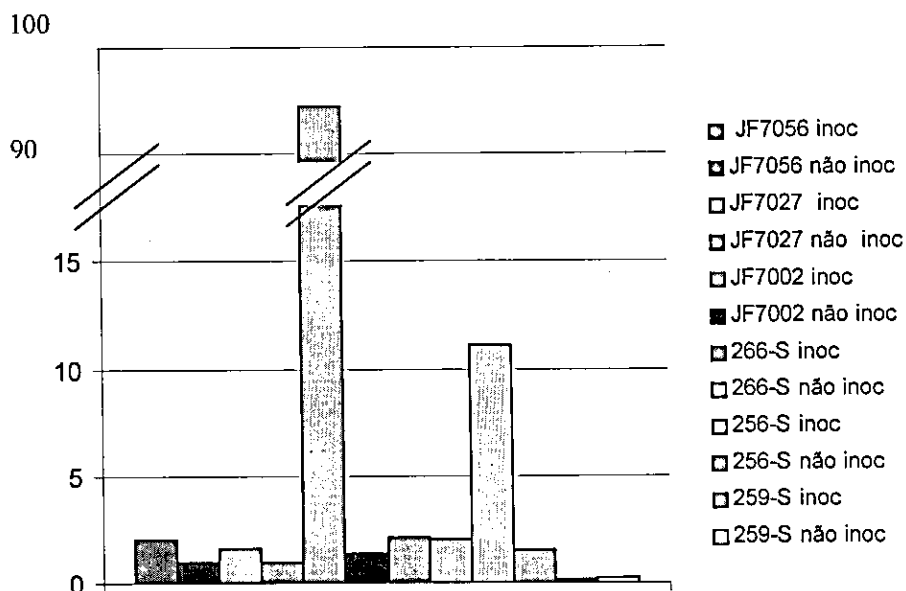


Gráfico 2. Gráfico mostrando a quantificação relativa da expressão do gene XET nos indivíduos da população. A amostra resistente JF7027 não inoculada foi utilizada como calibrador (valor 1). O cDNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coleta após a inoculação com juvenis do nematóide.

Os resultados mostraram que comparando-se as amostras resistentes com as suscetíveis, os indivíduos resistentes inoculados apresentaram maior expressão do gene da XET, confirmando os resultados obtidos com as amostras dos parentais.

A enzima xiloglucana endotransglicosilase é responsável por processos relacionados com a resposta da planta à infecção por patógenos como o espessamento de parede celular. Está envolvida principalmente em processos de modificação da parede celular, incluindo síntese e degradação de compostos. A enzima XET catalisa a quebra intramolecular de polímeros

de xyloglucanas, principal composto de proteínas estruturais da parede celular como hemicelulose, celulose, pectinas e outras (Campbell e Braam, 1999). Este espessamento da parede dificulta a penetração do nematóide nas células vegetais, evitando a infecção.

Estes resultados mostraram que a inoculação com juvenis do nematóide pode promover uma resposta da planta à infecção, uma vez que o espessamento da parede é um mecanismo primário de defesa contra patógenos. Outros estudos também serão realizados comparando-se os tratamentos em separado, ou seja, a expressão dos genes será quantificada nos dias um, três e seis após a inoculação, a fim de se verificar a existência de diferenças temporais de expressão gênica e se houver, qual o momento exato da indução que resulta em aumento da expressão da XET.

Referências

CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in plant science**. Vol 4. n 9. 361-366. 1999.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível no site <www.conab.gov.br> 2005.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br> 2005. Acesso em julho de 2006.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 127 p, 2001.

Avaliação da eficiência agronômica de inoculante líquido contendo bactérias do gênero *Azospirillum*

Lucas de Cássio Marques¹; Rubens José Campo². ¹Acadêmico de Biologia da UNIFIL; ²Embrapa Soja.

Introdução

As bactérias do gênero *Azospirillum*, em associação com as plantas, penetram no sistema radicular resultando em uma simbiose, que proporciona melhor nutrição à planta, especialmente nitrogênio (Drozdowicz, 1997). Estudos de competitividade entre as estirpes introduzidas com as nativas no solo têm mostrado que, aumentando a população da bactéria introduzida nas sementes através de inoculação, ocorre um melhor estabelecimento da estirpe no solo (Baldani, 2006). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido realizadas, em condições de laboratório, casa-de-vegetação e a campo, para selecionar novas estirpes e ou espécies de microrganismos capazes de melhorar a nutrição das culturas. Os estudos priorizam a inoculação de estirpes de *Azospirillum* em milho, trigo e cana-de-açúcar. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de um inoculante líquido argentino contendo bactérias do gênero *Azospirillum* no aumento do rendimento de grãos da cultura de trigo.

Material e Métodos

Experimentos foram instalados em Londrina, em casa-de-vegetação e a campo, em Londrina e Ponta Grossa, na safra de trigo de 2005. O delineamento experimental utilizado foi bloco ao acaso, com 6 repetições. O experimento de casa-de-vegetação, em vasos de 4,0 kg de solo, com o mesmo solo de Londrina (Latossolo Vermelho). As características químicas dos solos estudados estão descritas na Tabela 1. Os experimentos instalados no campo foram em parcelas experimentais de 4 x 5 m (área

útil de 2 x 3 m). A cultivar de trigo utilizada foi a BRS 208, com população de 300 plantas/m². A adubação básica consistiu da aplicação de 250 kg/ha da fórmula NPK (8-28-16). Para atender as doses complementares de N e a cobertura, utilizou-se como fonte de N a uréia. No perfilhamento foi coletado um metro linear de plantas para avaliação da massa seca da parte aérea e, a seguir, procedeu-se a aplicação de N em cobertura. As demais práticas culturais, como controle de plantas daninhas, insetos, etc, foram efetuadas conforme as recomendações técnicas para a cultura (Controle..., 2005).

Os experimentos foram constituídos dos seguintes tratamentos:

1. Sem inoculação;
2. Sem inoculação + 20 kg de N/ha na semeadura + 45 kg de N/ha em cobertura;
3. Sem inoculação + 10 kg de N/ha na semeadura + 22,5 kg de N/ha em cobertura;
4. Inoculação com o *Azospirillum* líquido (Argentina);
5. Inoculação com o *Azospirillum* líquido + 10 kg N/ha na semeadura e 22,5 kg N/ha em cobertura.

A Inoculação foi realizada com inoculante líquido argentino com bactérias do gênero *Azospirillum*, aplicado na dose de 10 mL/kg semente, e os parâmetros avaliados foram massa seca da parte aérea de um metro linear de plantas colhidas no perfilhamento, teores de N, P e K na massa seca das plantas, N total na massa seca e, em condições de campo, N total nos grãos e rendimento de grãos. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 1. Características químicas dos solos nos locais de instalação dos experimentos.

Locais	pH CaCl ₂	Al	K	Ca	Mg	H+Al	V %	C g/dm ³	P mg/dm ³
		cmol _c /dm ³							
Londrina	5,1	0,0	0,26	3,31	1,87	3,2	63,1	17,7	4,9
Ponta Grossa	5,4	0,0	0,12	2,80	1,90	3,4	58,5	26,5	2,5

Resultados

Análises do inoculante utilizado mostraram que o inoculante *Azospirillum* líquido apresentou uma população de bactérias em meio específico, conforme metodologia da RELARE, de $1,85 \times 10^8$ células/mL.

O experimento de casa-de-vegetação (Tabela 2) mostrou que a massa seca da parte aérea do tratamento inoculado foi superior à do tratamento sem inoculação, mas inferior aos tratamentos que receberam 50% da dose de N e ao tratamento que recebeu 100% da dose de N. Os resultados para teores de N na massa seca da parte aérea mostraram que a inoculação com *Azospirillum*, sem adubação com N, foi igual ao tratamento que recebeu 50% da dose de N. Verificou-se, ainda, que o tratamento que recebeu a inoculação e 50% de N apresentou a mesma concentração de N do que o tratamento que recebeu dose integral de N. Para o teor de N na massa seca, a inoculação com *Azospirillum* resultou em N total na massa seca superior ao do tratamento sem inoculação, mas inferior aos tratamentos que foram adubados com N.

Nos experimentos a campo, verificou-se que em Londrina não foram cons-

Tabela 2. Efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre a massa seca da parte aérea (g/pl), teor de N na massa seca (g/kg) e N total na massa seca (g/pl) de plantas de trigo em vasos com solo em casa-de-vegetação. Embrapa Soja. 2006.

Tratamentos (descritos no material e método)	MSPA* g/pl.	N g/kg	N g/pl.
1. Sem inoculação	3,7 d ¹	10,8 c	40,1 d
2. Sem inoculação + 20 kg N/ha semeadura + 45kg N/ha em cobertura	8,0 a	17,0 a	135,6 a
3. Sem inoculação + 10 kg N/ha semeadura + 22,5kg N/ha em cobertura	7,6 ab	13,7 b	102,1 b
4. Inoculação com <i>Azospirillum</i>	6,0 c	12,1 bc	72,3 c
5. Inoc. com <i>Azospirillum</i> + trat. 3	6,9 b	15,8 a	109,1 b
CV (%)	12,0	12,3	15,9

* Massa seca da parte aérea em g por planta de trigo.

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem do teste de Duncan a 5%.

tatadas diferenças entre os tratamentos para massa seca da parte aérea e rendimento de grãos, embora algumas diferenças estatísticas ocorreram nos demais parâmetros avaliados (Tabela 3). Para a massa seca da parte aérea, os teores de N, P e K, não diferiram para os tratamentos sem inoculação e inoculação com *Azospirillum*, mostrando que não houve efeito da inoculação. Nos grãos, verificou-se também que os resultados de teores de N nos grãos e N total nos grãos não diferiram para os tratamentos com e sem inoculação com *Azospirillum*, entretanto, os tratamentos que foram adubados com N apresentaram maiores teores de N e N total nos grãos, indicando que as plantas responderam com as adubações de N.

Tabela 3. Efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre a massa seca da parte aérea (g/pl), teores de N, P, K, na massa seca (g/kg), teor de N nos grãos (g/kg), N total nos grãos (kg/ha) e rendimento de grãos de trigo (kg/ha) em solo de Londrina, PR, safra 2005. Embrapa Soja. 2006.

Tratamentos (descrito material e método)	Tecido				Grãos		
	MSPA (g/pl)	N (g/kg)	P (g/kg)	K (g/kg)	N (g/kg)	N (kg/ha)	Rend. (kg/ha)
1	48,7	29,7 b ¹	2,2 ab	52,9 ab	22,2 b	37,1 b	1657
2	57,7	35,7 a	2,5 a	59,4 a	26,6 a	50,5 a	1894
3	56,4	32,8 ab	2,4 a	54,9 ab	24,6 ab	42,0 ab	1712
4	52,6	29,8 b	2,0 b	51,9 b	23,3 b	38,4 b	1617
5	54,3	32,1 ab	1,9 b	53,3 ab	24,4 ab	41,7 ab	1706
CV (%)	26,0 ns	10,4	13,0	10,8	10,6	23,4	16,6 ns

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem do teste de Duncan a 5%.

Em Ponta Grossa, dos parâmetros avaliados por ocasião da coleta de plantas, somente houve diferença estatística para teores de N e P na massa seca da parte aérea (Tabela 4). Os teores de N na massa seca dos tratamentos com e sem inoculação com *Azospirillum* não diferiram entre si e foram inferiores aos tratamentos que receberam N da adubação. Em relação aos teores de P na massa seca, o tratamento inoculado com *Azospirillum* apresentou teores de P superiores ao tratamento sem inoculação e iguais aos tratamentos com N.

Tabela 4. Efeito da aplicação de *Azospirillum* sobre a massa seca da parte aérea (g/pl), teores de N, P, K, na massa seca (g/kg), teor de N nos grãos (g/kg), N total nos grãos (kg/ha) e rendimento de grãos de trigo (kg/ha) em solo de Ponta Grossa, Pr, safra 2005. Embrapa Soja. 2006.

Tratamentos (descrito material e método)	Tecido				Grãos		
	MSPA (g/pl)	N g/kg	P g/kg	K g/kg	N g/kg	N kg/ha	Rend. kg/ha
1	46,4	22,6 b ¹	1,5 b	40,1	24,4	36,8	1361
2	59,7	26,1 a	2,2 a	43,3	26,1	35,4	1505
3	59,8	23,7 ab	2,5 a	46,8	26,1	41,4	1582
4	53,9	22,1 b	2,3 a	43,3	26,2	40,9	1562
5	53,8	24,0 ab	2,4 a	41,1	26,0	38,8	1483
CV (%)	14,7 ns	6,4	11,1	9,4 ns	4,2 ns	23,4 ns	22,0 ns

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem do teste de Duncan a 5%.

Consideração Final

A metodologia de análise efetuada não permitiu diferenciar os tratamentos em condições de campo em Londrina e Ponta Grossa. Em casa-de-vegetação, no entanto, constata-se que a inoculação com *Azospirillum* favoreceu a produção de massa seca da parte aérea, teores de N na massa seca e de N total acumulado na massa seca das plantas de trigo, em relação ao tratamento sem inoculação. Sugere-se que estudos adicionais em outras culturas sejam efetuados para melhor avaliação da tecnologia.

Referências

BALDANI, V. L. D. **Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas.** RELARE, 13., 2006, Londrina.

CONTROLE de doenças. In: REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 20., 2005, Londrina.

Informações técnicas da comissão centro-sul brasileira de pesquisa de trigo e triticales para a safra de 2005. Londrina: EMBRAPA, 2005. p. 171-187.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados.** Planaltina: Embrapa –CPAC, 1997. p. 43-44.

Eficiência agronômica de inoculante líquido composto de bactérias do gênero *Azospirillum*

Lucas de Cássio Marques¹; Rubens José Campo². ¹Acadêmico de Biologia da UNIFIL; ²Embrapa Soja.

Introdução

As bactérias do gênero *Azospirillum* que ocorrem em grande abundância em climas tropicais são fixadoras de nitrogênio no solo, formando associações em diferentes espécies de vegetais (Drozdowicz, 1997). Diversos estudos relatam que as bactérias nativas e as introduzidas pela inoculação nas sementes proporcionam melhor estabelecimento da estirpe no solo. (Baldani, 2006). Sendo assim inúmeras pesquisas têm sido realizadas em condições de laboratório, casa-de-vegetação e campo, visando selecionar novas estirpes que proporcionem uma melhor nutrição nas culturas de milho, trigo e cana-de-açúcar, e com grande expectativa de sucesso no uso de estirpes de *Azospirillum*. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de um inoculante líquido brasileiro contendo bactérias do gênero *Azospirillum* no aumento do rendimento de grãos da cultura de trigo.

Material e Métodos

Os experimentos foram instalados em casa-de-vegetação em Londrina e a campo, em Londrina e Ponta Grossa, na safra de trigo de 2005. O delineamento experimental utilizado foi bloco ao acaso com 6 repetições. O experimento de casa-de-vegetação, em vasos de 4,0 kg de solo, com o mesmo solo de Londrina (Latossolo Vermelho). As características químicas dos solos estudados estão descritas na Tabela 1. Os experimentos instalados em campo foram em parcelas experimentais de 4 x 5 m (área útil de 2 x 3 m). A cultivar de trigo utilizada foi a BRS 208, com uma popu-

Tabela 1. Características químicas dos solos nos locais de instalação dos experimentos.

Locais	pH (CaCl ₂)	Al	K	Ca	Mg	H+Al	V %	C g/dm ³	P mg/dm ³
		cmol _c /dm ³							
Londrina	5,1	0,0	0,26	3,31	1,87	3,2	63,1	17,7	4,9
Ponta Grossa	5,4	0,0	0,12	2,80	1,90	3,4	58,5	26,5	2,5

lação de 300 plantas/m². A adubação básica consistiu da aplicação de 250 kg/ha da fórmula NPK (8-28-16). Para atender as doses complementares de N e a cobertura, utilizou-se como fonte de N a uréia. No perfilhamento foi coletado um metro linear de plantas para avaliação da massa seca da parte aérea e, a seguir, procedeu-se a aplicação de N em cobertura. As demais práticas culturais, como controle de plantas daninhas, insetos, etc, foram efetuadas conforme as recomendações técnicas para a cultura do trigo (Ccontrolle ..., 2005).

Os experimentos foram constituídos dos seguintes tratamentos:

1. Sem inoculação;
2. Sem inoculação + 20 kg de N/ha na semeadura + 45 kg de N/ha em cobertura no perfilhamento, fonte uréia;
3. Sem inoculação + 10 kg de N/ha na semeadura + 22,5 kg de N/ha em cobertura no perfilhamento, fonte uréia;
4. Inoculação com o *Azospirillum* líquido (brasileiro);
5. Inoculação com o *Azospirillum* líquido + 10 kg N/ha na semeadura e 22,5 kg N/ha em cobertura no perfilhamento, fonte uréia.

A inoculação foi realizada com inoculante líquido brasileiro com bactérias do gênero *Azospirillum*, aplicado na dose 10 mL/kg semente. Os parâmetros avaliados foram massa seca da parte aérea de um metro linear de plantas colhidas no perfilhamento, teores de N, P e K na massa seca das plantas, N total na massa seca e, em condições de campo, N total dos grãos e rendimento de grãos. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

Resultados

A análise do inoculante *Azospirillum* líquido apresentou uma população de bactérias em meio específico, conforme metodologia da RELARE, de $8,2 \times 10^8$ células/mL.

O experimento conduzido em casa-de-vegetação (Tabela 2) mostrou que a massa seca da parte aérea do tratamento inoculado foi superior ao tratamento sem inoculação, igual aos tratamentos com adubação com 50% da dose de N e inoculação mais 50% da dose de N e inferior ao tratamento com dose completa de N. Os resultados para teores de N na massa seca da parte aérea mostraram valores similares entre os tratamentos com dose máxima de N e o tratamento inoculado com *Azospirillum*, este não diferiu dos tratamentos que receberam 50% da dose de N, inoculado ou não. Os resultados para N total na massa seca mostraram que a inoculação com *Azospirillum* apresentou N total na massa seca superior à do tratamento sem inoculação, mas inferior aos tratamentos que só receberam adubação nitrogenada.

Tabela 2. Efeito da aplicação de *Azospirillum* sobre a massa seca da parte aérea de plantas de trigo (g/pl), teor de N na massa seca (g/kg) e N total na massa seca (g/pl) em vasos com solo em casa-de-vegetação. Embrapa Soja. 2006.

Tratamentos (descrito no material e método)	MSPA* g/pl.	N g/kg	N g/pl.
1. Sem inoculação	3,7 d ¹	10,8 c	40,1 d
2. Sem inoculação + 20 kg N/ha semeadura + 45 kg N/ha cobertura	8,0 a	17,0 a	135,6 a
3. Sem inoculação + 10 kg N/ha semeadura + 22,5 kg N/ha cobertura	7,6 ab	13,7 b	102,1 b
4. Inoculação com <i>Azospirillum</i>	5,7 c	13,9 ab	75,6 c
5. Inoculação c/ <i>Azospirillum</i> + trat. 3	6,6 bc	13,2 bc	91,3 bc
CV (%)	14,2	12,3	16,2

* MSPA - massa seca da parte aérea de plantas de trigo em g por planta.

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

Nos experimentos de campo, verificou-se que em Londrina, apesar das condições climáticas terem ocorrido de forma regular e/ou suplementadas com irrigação quando necessário, os resultados de rendimento de grãos foram muito baixos (Tabela 3). Em Ponta Grossa, dentre os parâmetros avaliados por ocasião da coleta de plantas, somente houve diferenças estatísticas nos teores de fósforo na massa da parte aérea seca (Tabela 4). Os resultados dos parâmetros avaliados nos grãos não mostraram diferenças entre os tratamentos, ou seja, todos os tratamentos, inoculados ou não, e os adubados ou não, apresentaram resultados similares para teor de N nos grãos, N total nos grãos e rendimento de grãos.

Tabela 3. Efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre a massa seca da parte aérea (g/pl), teor de N, P, K, na massa seca (g/kg), teores de N nos grãos (g/kg), N total nos grãos (kg/ha) e rendimento de grãos de trigo (kg/ha) em solo de Londrina, PR, safra 2005. Embrapa Soja. 2006.

Tratamentos (descrito material e método)	Tecido				Grãos		
	MSPA (g/pl)	N g/kg	P g/kg	K g/kg	N g/kg	N kg/ha	Rend. kg/ha
1	30,2	28,3	2,4	43,6	28,3	17,2	613
2	34,4	27,6	2,4	41,9	30,2	20,0	662
3	37,5	27,3	2,7	41,5	29,4	19,9	682
4	39,9	26,1	2,6	39,8	28,6	22,2	776
5	37,2	28,0	2,7	40,7	29,8	26,1	876
CV (%)	26,2ns ¹	7,4ns	9,0ns	10,0ns	4,2ns	25,2ns	25,6ns

¹ Não significativo pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 4. Efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre a massa seca da parte aérea (g/pl), teor de N, P, K, na massa seca (g/kg), teores de N nos grãos (g/kg), N total nos grãos (kg/ha) e rendimento de grãos de trigo (kg/ha) em solo de Ponta Grossa, PR, safra 2005. Embrapa Soja. 2006.

Tratamentos (descrito material e método)	Tecido				Grãos		
	MSPA (g/pl)	N g/kg	P g/kg	K g/kg	N g/kg	N kg/ha	Rend. kg/ha
1	49,2	23,2	1,7 a ¹	40,0	24,8	43,7	1658
2	56,5	26,3	1,7 a	42,9	24,9	41,0	1597
3	55,2	26,3	1,6 ab	40,1	25,3	40,9	1622
4	44,6	24,0	1,6 ab	41,5	24,6	40,4	1772
5	51,6	26,1	1,4 b	38,9	24,6	39,7	1637
CV (%)	17,7ns	14,3ns	10,2	10,2ns	3,7ns	14,2ns	14,1ns

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferem do teste de Duncan a 5%.

Consideração final

A metodologia de análise efetuada não permitiu diferenciar os tratamentos em condições de campo em Londrina e Ponta Grossa. Em casa-de-vegetação, no entanto, constatou-se que a inoculação com *Azospirillum* favorece a produção de maior massa seca da parte aérea, teores de N na massa seca e N total nas plantas de trigo em comparação com o tratamento sem inoculação. Sugere-se que estudos adicionais em outras culturas sejam efetuados para melhor avaliação da tecnologia.

Referências

- BALDANI, V. L. D. **Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas.** RELARE, 13., 2006, Londrina.
- CONTROLE de doenças. In: REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 20., 2005, Londrina.

Informações técnicas da comissão centro-sul brasileira de pesquisa de trigo e tritcale para a safra de 2005. Londrina: EMBRAPA, 2005. p. 171-187.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados.** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p. 43-44.

Algumas respostas da soja a diferentes disponibilidades hídricas do solo

Rafael Victor¹; Jeani Delgado Paschoal Moura²; José Renato Bouças Farias³.

¹Bolsista CNPq/PIBIC; ²Orientador na Universidade Estadual de Londrina; ³Embrapa Soja.

Introdução

O déficit hídrico, fator determinante que impede o desenvolvimento das plantas, preocupa os produtores que não possuem maneiras, economicamente viáveis, de controlá-lo. Segundo Göpfert, citado por Casagrande *et al* (2002), observa-se ao longo das safras de verão no Brasil, que grandes perdas na produtividade foram motivadas em decorrência do déficit hídrico (71% dos casos), seguido por chuvas excessivas (22% dos casos).

Para tanto, demonstrar a resistência e/ou tolerância das cultivares de soja frente ao déficit hídrico se faz necessário. A criação de um banco de dados com informações das cultivares pode ajudar a gerar propostas para um melhor manejo da cultura e para o melhoramento genético da espécie, visando à minimização dos riscos que a natureza coloca sobre a agricultura.

A planta, em solos com deficiência hídrica, tem que desenvolver a capacidade de manter-se com certo nível de água, principalmente nas horas mais críticas do dia (onde a demanda evaporativa da atmosfera é elevada); associado a isto, o sistema radicular deve ser bem desenvolvido. É observado que a planta desenvolve mecanismos de sobrevivência a déficits hídricos onde estes variam de cultivar para cultivar e dizem respeito a tolerar, escapar ou evitar o déficit hídrico.

No primeiro, a planta sobrevive a uma elevada deficiência hídrica; no segundo, a planta completa seu ciclo antes do período de estiagem; no terceiro caso, a planta mantém um potencial elevado de água nos tecidos (Klar *et al.*, 1985).

Avaliações agrônômicas e fisiológicas permitem avaliar o comportamento das cultivares de soja sob diferentes disponibilidades hídricas do solo. Com isso, pode-se subsidiar ainda a indicação de cultivares que ofereçam menores riscos de perdas na produtividade conforme as características climáticas de cada região produtora.

O presente trabalho visa apresentar algumas respostas agrônômicas e fisiológicas das cultivares de soja submetidas a diferentes disponibilidades hídricas do solo na safra 2005/2006.

Material e Métodos

O experimento desenvolveu-se no campo experimental da Embrapa Soja, em Londrina-PR (latitude 23° 11' S, longitude 51° 11' W, a altitude de 566m), na safra 2005/2006. A semeadura foi efetuada no dia 04 de dezembro de 2005 com dez diferentes cultivares (BR-16, Embrapa-48, BRS-133, BRS-134, BRS-183, BRS-184, BRS-214, BRS-232, BRS-245 RR e BRS-247 RR), e a colheita realizada no decorrer do mês de abril de 2006.

As cultivares de soja foram submetidas a distintas condições hídricas do solo. Foram avaliadas as respostas agrônômicas e fisiológicas de cada cultivar. As condições que se efetivaram para que propiciasse diferentes disponibilidades hídricas no solo foram: Déficit Hídrico no Reprodutivo (Abrigo); Condições Normais de Campo (Não-Irrigado) e; Condições Ótimas de Umidade (Irrigado).

Para obter níveis mais severos de déficit hídrico, no período reprodutivo, utilizou-se abrigos automáticos para evitar a precipitação pluviométrica. Foram utilizadas 4 repetições e o delineamento de parcelas subdivididas, ficando a disponibilidade hídrica na parcela e cultivares nas subparcelas. Nos abrigos, cada subparcela ficou com 4,5 m² de área. As cultivares ficaram sob condições normais de campo até o estágio R1 (início do florescimento). Quando as plantas atingiram R1 (21/01/2006), iniciou-se o fechamento dos abrigos ao chover, por um período de 34 dias.

As subparcelas do descoberto (Não-Irrigado e Irrigado) foram estabelecidas com uma área de 24m². No Irrigado, a suplementação hídrica foi efetivada

manualmente com mangueiras orientadas para as parcelas. O potencial matricial da água no solo foi mantido em torno de -0,03 a -0,05 MPa, sendo controlada a umidade com a ajuda de tensiômetros de mercúrio. Também se controlou a umidade do solo através de coletas semanais de solo dentro de cada parcela com profundidades de 0 a 20 cm e de 20 a 40 cm.

No decorrer do experimento, foram monitorados alguns elementos meteorológicos (temperatura máxima, mínima e média do ar; umidade relativa do ar; precipitação pluviométrica e radiação fotossinteticamente ativa) para caracterizar a demanda evaporativa da atmosfera. As avaliações fisiológicas, em campo, se deram em folhas completamente expandidas do terço superior da planta, no folíolo central.

Resultados e Discussão

Antes do início do fechamento dos abrigos ao chover, houve 13 dias sem chuva. Portanto, a condição de déficit hídrico sofreu um estresse total de 47 dias.

Na primeira data de leitura (18/01/2006), as cultivares, nas distintas condições hídricas, apresentaram taxa fotossintética similares, por não haver iniciado ainda o fechamento dos abrigos.

Na Figura 1 (28 dias de déficit hídrico) observa-se a queda acentuada da taxa fotossintética nas plantas submetidas ao déficit hídrico. Na média geral das leituras nas três disponibilidades hídricas do solo, a cultivar BRS-184, seguida da BRS-214, apresentavam melhores valores de taxa fotossintética. As cultivares BR-16 e BRS-245 RR apresentavam os menores valores de taxa fotossintética. A variabilidade de parâmetros fisiológicos é muito grande, dependendo muito das condições ambientais.

O Teor Relativo de Água (Figura 2) demonstra que a cultivar BRS-184, na média entre as distintas condições hídricas do solo, teve um melhor índice de manutenção de água em seus tecidos. Isso pode explicar, em parte, a alta taxa fotossintética da cultivar. Porém, o alto teor de água nos tecidos da cultivar, comparativamente, também pode estar associado a um sistema radicular bem desenvolvido. A cultivar BRS-232 apresenta uma maior sensibilidade ao déficit hídrico.

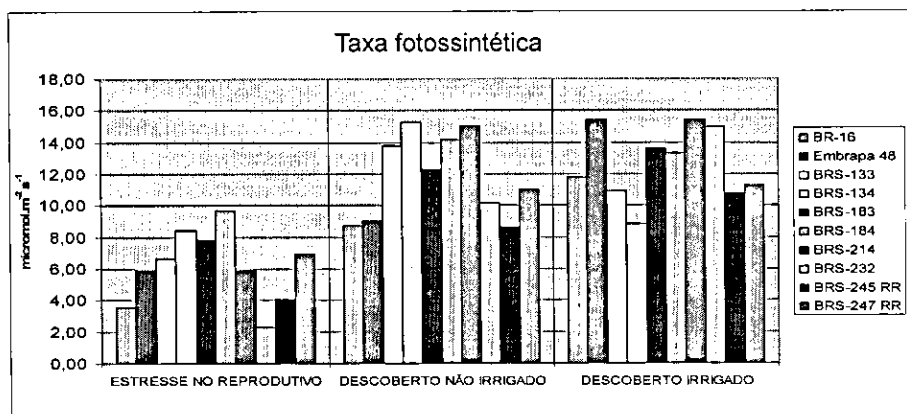


Figura 1. Taxa Fotossintética, observada nas três condições hídricas e dez cultivares de soja, em 02/02/06.

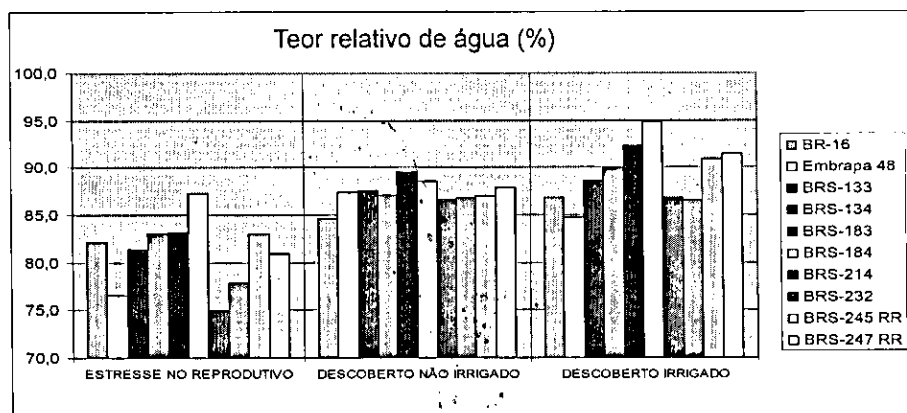


Figura 2. Teor Relativo de Água, observado nas três condições hídricas e dez cultivares de soja, em 08/02/06.

Analisando o Rendimento de Grãos (Figura 3), nota-se que, na condição de déficit hídrico, todas as cultivares apresentaram uma baixa produtividade. Percebe-se que o Irrigado teve uma produtividade 31% maior em relação à condição Não-Irrigado. A cultivar BRS-184 apresentou rendimento de grãos maior que as demais, em todas as disponibilidades hídricas.

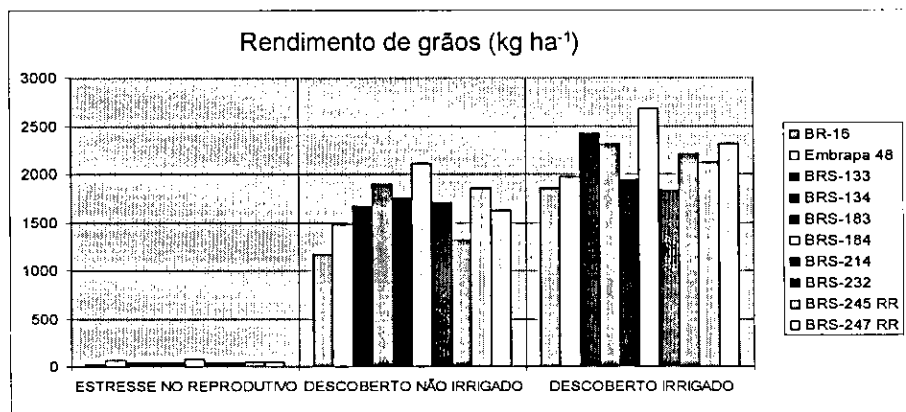


Figura 3. Rendimento de Grãos, observado nas três condições hídricas e dez cultivares de soja, na colheita.

O Peso Seco de Sementes, obtido das diferentes cultivares sob distintas condições hídricas do solo, é apresentado na Figura 4. Percebe-se uma boa correlação entre peso de sementes e rendimento de grãos em condição ótima de umidade. Porém, em condição normal ou com déficit acentuado, outros componentes do rendimento parecem ter maior importância, como número de grãos por planta ou número de plantas/m².

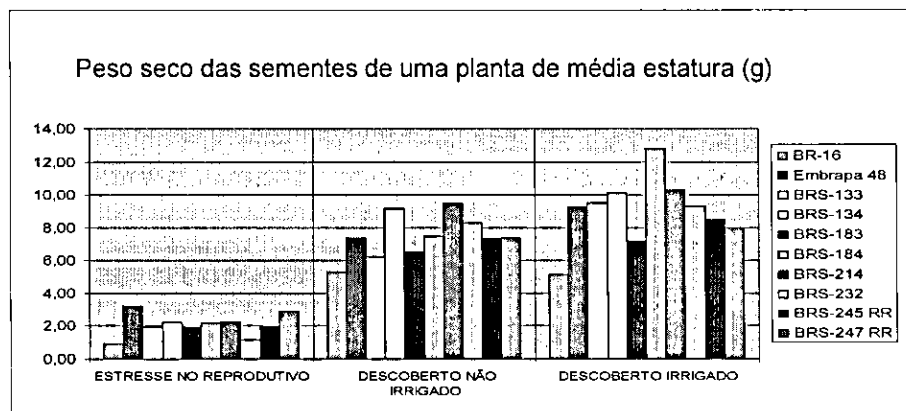


Figura 4. Peso Seco das Sementes, observado nas três condições hídricas e dez cultivares de soja, na colheita.

Referências

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica diferencial durante o déficit hídrico em soja. **Rev. Brasileira de fisiologia vegetal**, Londrina, v. 13, nº 2, p. 168-184, ago/2002.

KLAR, A. E.; CATANEO, A.; DENADAI, I. A. M.; SAAD, J. C. C.; PICARELLI, M. Medidas de adaptação de plantas de trigo e déficits hídricos. **Científica**, São Paulo, v. 3, n. 113, p. 117-127, 1985.

Avaliação fisiológica de cultivares de soja submetidas a diferentes condições hídricas do solo

Hugo Ribeiro Borges de Paula¹; Geraldo Terceiro Correa²; José Renato Bouças Farias³. ¹Bolsista de graduação da Embrapa; ²Orientador na Universidade Estadual de Londrina; ³Embrapa Soja.

Introdução

De acordo com Hymowitz, citado por Marion (2004), a cultura de soja, cuja origem é asiática, apareceu por volta do século XVII a.C., no nordeste da China.

No Brasil, segundo Hasse, citado por Marion (2004, p.23), a soja foi introduzida por imigrantes japoneses, por volta de 1908, e seu cultivo se deu em hortas domésticas no interior do Estado de São Paulo, com pequenas produções voltadas à fabricação caseira de tofu.

O desenvolvimento da cultura de soja ganhou destaque a partir da década de 70 e, desde então, começou a se expandir. Tal crescimento é devido ao baixo custo de sua produção em relação ao seu alto valor nutritivo, o que faz dela uma das melhores e mais baratas fontes de alimento energético, em termos de caloria por unidade de custo de produção.

No atual cenário econômico, a soja destaca-se entre as demais culturas e é justamente por isso que se buscam novas informações, visando otimizar seu cultivo e reduzir os riscos de perdas. Dentre os fatores inerentes à produção agrícola, o clima tem se mostrado como um fator determinante e que acaba por reduzir a produtividade da soja devido à deficiência hídrica. Essa, por sua vez, apresenta consequências mais severas durante as fases de germinação e enchimento de grãos.

Conforme Nepomuceno et al. (1993), em experimentos já realizados na Embrapa Soja, com diferentes cultivares de soja submetidas a dois níveis de água no solo, a campo, com e sem irrigação e em casa-de-vegetação,

em vasos com 25% e 35% de umidade gravimétrica, os comportamentos obtidos nos dois ambientes foram semelhantes. Taxa fotossintética, resistência estomatal e teor relativo de água foram os parâmetros mais representativos do estado de água na planta. Observaram ainda que, à medida que a intensidade do déficit hídrico acentuou, o teor de clorofila, a taxa fotossintética e o teor relativo de água reduziram, ao passo que a resistência estomatal elevou.

O objetivo deste trabalho foi analisar as respostas fisiológicas de cultivares de soja a diferentes disponibilidades hídricas no solo, em experimentos realizados no campo.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Soja, situada no município de Londrina, durante a safra 2004/2005, envolvendo dez cultivares de soja submetidas a diferentes disponibilidades hídricas do solo.

No campo, foram avaliadas três condições hídricas às plantas: abrigo (déficit hídrico na fase reprodutiva), descoberto não irrigado e descoberto irrigado. Para isso, foram utilizados blocos delineados ao acaso, contendo quatro repetições e parcelas subdivididas. Nas parcelas estavam os níveis de umidade do solo enquanto que nas subparcelas avaliaram-se as dez cultivares de soja (BR-16, BR-36RCH, Embrapa 48, BRS-133, BRS-183, BRS-184, BRS-214, BRS-230, BRS-231 e BRS-232).

Nos tratamentos, não irrigado e irrigado, cada subparcela foi formada por oito linhas, com 0,5 m de entrelinhas e com uma área total de 24m².

O tratamento déficit hídrico possuía seis abrigos divididos em quatro repetições. A repetição I está contida nos abrigos 1 e 2, assim como a repetição II está contida nos abrigos 3 e 4. Essas repetições possuíam 10 subparcelas, cada uma com 9 m² de área. Enquanto as repetições III e IV estavam contidas nos abrigos 5 e 6, respectivamente e apresentavam metade da área das subparcelas das repetições I e II, pois as dez cultivares estavam dentro de um mesmo abrigo.

Cada parcela possuía um par de tensiômetros de mercúrio, sendo um instalado a 15 cm e outro a 30 cm de profundidade. A irrigação no tratamento irrigado se dá quando o mercúrio do tensiômetro de 30 cm de profundidade atinge a altura de 20 cm.

A semeadura foi realizada em 08 de dezembro de 2004 e a data da colheita foi no período de 23 de março de 2005 a 15 de abril de 2005.

Os abrigos ficaram ligados, para fechamento automático ao chover, do dia 24 de janeiro de 2005 a 01 de março de 2005.

Foi avaliada a taxa fotossintética em diferentes períodos, utilizando-se um IRGA, da LI-COR, modelo LI-6200. As avaliações foram feitas pela manhã, em folíolos do terço superior da planta, sendo feitas de duas a três leituras por subparcela (cultivar).

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra as médias da taxa fotossintética de duas cultivares de soja, uma menos sensível (BRS-184) e a outra mais sensível (BR-16) a seca, todas realizadas em quatro datas diferentes do mês de fevereiro e submetidas às três condições hídricas.

De acordo com os resultados obtidos com a leitura de taxa fotossintética, pode-se observar melhor desempenho da cultivar BRS-184 nos três níveis de água em relação a cultivar BR-16.

Pela análise da Figura 1, é importante notar que, à medida que aumentava o déficit hídrico, a taxa fotossintética da cultivar BR-16 reduzia cada vez mais. Isso pode ser explicado também pelo fato da mesma se encontrar em uma das fases mais críticas em relação à seca, ou seja, a fase que vai do início da floração ao enchimento de grãos. Tal fato também pode ser notado com a BRS-184, se manifestando um pouco mais tolerante na fase inicial do déficit hídrico e uma queda maior entre a segunda e a terceira medida de taxa fotossintética.

Nas outras condições (descoberto irrigado e descoberto não irrigado), não houve mudanças expressivas. Observa-se ainda que no período entre a terceira e a última leitura de fotossíntese, tanto a BR-16 quanto a BRS-184,

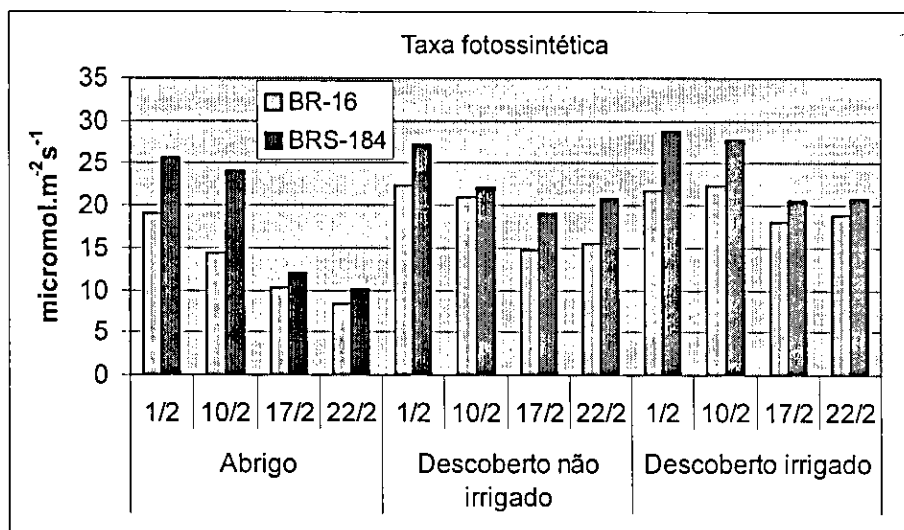


Figura 1. Evolução da taxa fotossintética observada em duas cultivares de soja, submetidas a distintas condições de disponibilidade hídrica.

apresentaram um pequeno aumento na taxa fotossintética, fato que pode ser explicado pela ocorrência de condições mais favoráveis às plantas, como maior radiação solar.

Referências

MARION, E. **Parâmetros hídricos para estimativa do rendimento de grãos de soja.** 2004. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. Respostas fisiológicas de cultivares de soja a disponibilidade hídrica no solo. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. São Carlos, v. 5, n. 1, p. 57, jun. 1993.

Respostas a avaliações agronômicas de cultivares de soja submetidas a déficit hídrico

Vinícios José Dias¹; Jose Renato Bouças Farias²; Osvaldo Coelho Pereira Neto³.

¹Bolsista da graduação da Embrapa; ²Orientador da Embrapa Soja; ³Orientador UEL.

Introdução

Originária do sudeste asiático e introduzida por imigrantes japoneses, no início do século XX, a soja se tornou um dos maiores produtos de exportação e geração de divisas, contribuindo significativamente para o superávit da balança comercial. Apesar de todas as implicações ambientais, como, por exemplo, o desmatamento de grandes áreas para a implantação de monocultura, e sociais, como a concentração latifundiária, devido ao fato de a soja ser uma cultura típica de *plantations* e, portanto, necessitar de grandes áreas para a devida viabilidade econômica; e êxodo rural, devido à implantação de novas tecnologias no campo, sem as quais é impossível o cultivo de soja e que dispensaram uma enorme quantidade de trabalhadores do campo, entre outras, a soja se tornou o símbolo do agronegócio brasileiro.

Nesse sentido torna-se importante o aumento de produtividade, visando obter maiores rendimentos e menores riscos. Uma das alternativas é o desenvolvimento de cultivares de soja com maior produtividade. No entanto, as pesquisas realizadas nessa área enfocavam, principalmente o aumento de rendimento. Praticamente, desconsideravam o problema da deficiência hídrica, resultando em grande sensibilidade ao clima (Pedroso, 2000), sendo o clima o principal fator responsável pelas oscilações anuais da produção (Camargo *apud* Pedroso, 2000).

As secas são as principais causadoras da queda de produtividade de soja no Brasil, e na safra 2004/2005 foram responsáveis por até 80% das perdas das lavouras (Farias et al., 2006).

A deficiência hídrica causa sérias conseqüências nas fases de germinação e emergência, no florescimento e no enchimento de grãos (Fageria *apud* Cavenaghi, 2002).

Quanto aos parâmetros agronômicos mais representativos, Fageria (1989) chegou à conclusão de que o número de vagens por unidade de área, o número de grãos por vagem, o peso dos grãos e o índice de área foliar são os principais determinantes da produtividade de soja.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas agronômicas de dez cultivares de Soja submetidas à diferentes níveis de déficit hídrico.

Material e Métodos

As avaliações das respostas agronômicas da soja a diferentes níveis de disponibilidade hídrica do solo foram realizadas em campo na área experimental da Embrapa Soja, na safra 2004/2005, sendo avaliado o comportamento de dez cultivares: BR-16, BR-36 RCH, Embrapa 48, BRS-133, BRS-183, BRS-184, BRS-214, BRS-230, BRS-231 e BRS-232.

Durante todo o ciclo avaliaram-se, semanalmente, os seguintes parâmetros agronômicos: índice de área foliar, estatura de plantas, peso fresco e peso seco da parte aérea de cinco plantas coletadas por parcela. O estágio de desenvolvimento foi observado a cada 15 dias.

Na colheita, foram avaliados o número de legumes por planta, o número de sementes por legume, o peso seco de cem sementes, e o rendimento de grãos.

A semeadura foi realizada em oito de dezembro de 2004 e a colheita entre os dias 23 de março e 15 de abril de 2005, dependendo do ciclo da cultivar. Foram utilizados blocos delineados ao acaso com quatro repetições e com parcelas subdivididas, ficando nas parcelas os níveis de umidade do solo e nas subparcelas as diferentes cultivares. As plantas foram submetidas a três condições de umidade: com irrigação manual (determinada sempre pela altura da coluna de mercúrio do tensiômetro quando o potencial matricial da água no solo se encontrava em torno de $-0,03$ a $-0,05$ Mpa); não-irrigado, onde foram mantidas as condições hídricas naturais; e níveis

drásticos de déficit hídrico, onde para o controle da ocorrência destes em diferentes fases de desenvolvimento da planta, foram utilizados abrigos móveis automáticos que, de acordo com a programação prévia, impediram a precipitação pluviométrica sobre as parcelas, fechando-se automaticamente, na ocorrência de chuvas, desde o início do período reprodutivo até R5 aproximadamente.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foram focados resultados das avaliações mais importantes, como, índice de área foliar, número de legumes com sementes por planta, estatura, rendimento,

a) Rendimento de grãos (Figura 1): os maiores valores de rendimento de grãos, em todos os cultivares, foram obtidos nas parcelas irrigadas, e os menores rendimentos foram observados na condição com déficit hídrico (estresse sob os abrigos). No tratamento não-irrigado, a mais produtiva foi a cultivar BRS-214; no tratamento irrigado a melhor cultivar foi a BRS-184; no tratamento de estresse hídrico as cultivares BRS-231 e BRS-214 foram as que se saíram melhores.

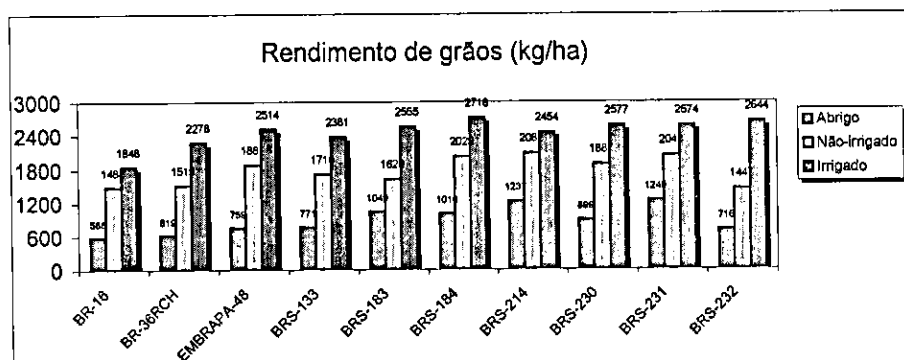


Figura 1. Médias de rendimentos de grãos observadas nas três condições de disponibilidade hídrica, em dez cultivares de soja.

- b) **Peso Seco de grãos (Figura 2):** Os maiores valores de rendimentos de grãos, em todos os cultivares, foram obtidos nas parcelas irrigadas, e os menores rendimentos foram observados na condição de déficit hídrico (estresse sob os abrigos), exceto para a cultivar Embrapa 48 em que o tratamento não-irrigado foi melhor que o irrigado.

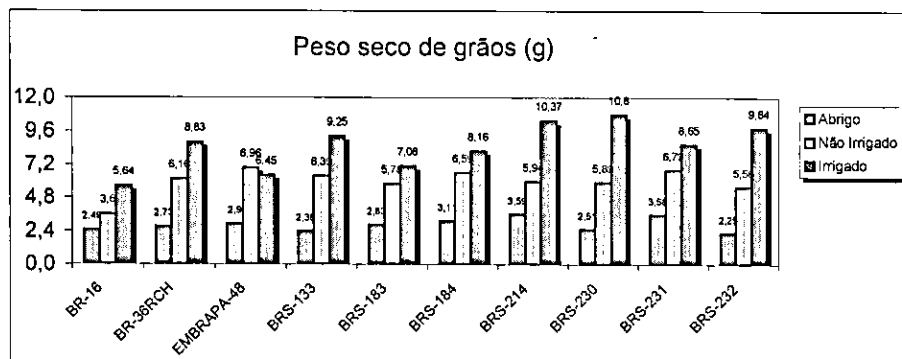


Figura 2. Médias de peso seco de grãos observadas nas três condições de disponibilidade hídrica, em dez cultivares de soja.

- c) **Área Foliar:** na Figura 3 são apresentadas a revolução da área foliar das cultivares BR-16 e BRS-241. Independentemente da condição hídrica, observa-se um aumento da área foliar até um determinado momento, a partir do qual ocorre uma queda da área foliar. Para as duas cultivares, maiores valores de área foliar foram observados na condição irrigada, ao longo de todo o ciclo. A cultivar BRS-214 apresentou maior área foliar que a BR-16, o que pode ajudar a explicar os maiores rendimentos de grãos obtidos.

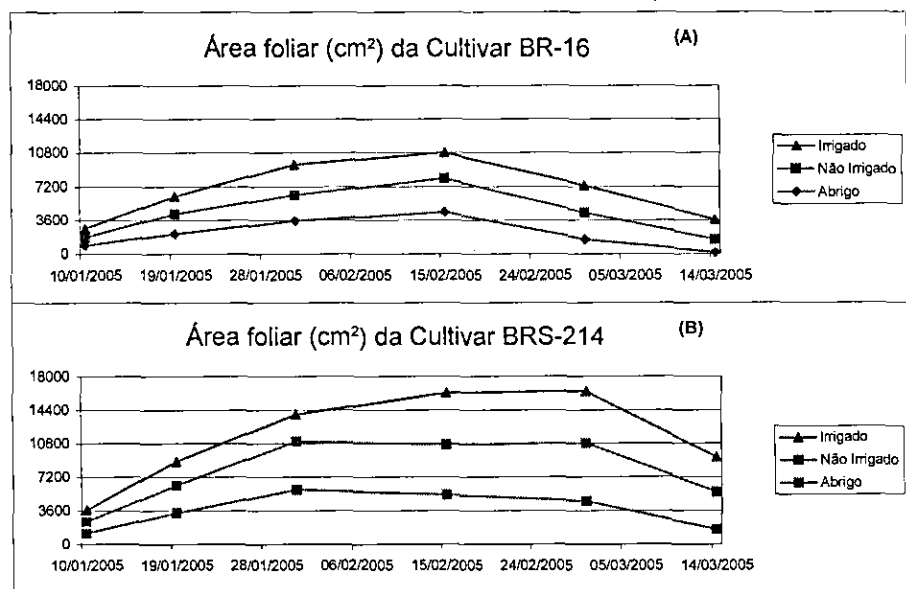


Figura 3. Evolução da área foliar observada nas três cultivares BR-16 em (A) e BRS-214 em (B), em três condições hídricas.

Referências

- CAVENAGHI, M. P. **Resposta da cultura de soja à disponibilidade hídrica.** Londrina, PR: Embrapa-CNPSO, 2002. Relatório de Estágio.
- FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas.** 1 ed. Brasília: Departamento de Publicações EMBRAP-CNPAF, 1989. p. 381-392.
- FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; TOBITA, S.; ALMEIDA, I. R. **Restrições da Disponibilidade Hídrica à Obtenção de Elevados Rendimentos de Grãos de Soja.** In: Congresso de Soja Del Mercosur, 3, Mercosoj, 2006. Rosário, Argentina. 2006. p. 65-67.
- PEDROSO, J. C. **Resposta da cultura de soja à disponibilidade hídrica.** Londrina, PR: Embrapa-CNPSO, 2000. Relatório de Estágio.

Respostas morfofisiológicas de plantas transformadas com a construção Rd29: Dreb1A, submetidas ao déficit hídrico

Flávio Ranucci Pinheiro¹; João Antonio Zeqqui²; Alexandre Lima Nepomuceno³.

¹Bolsista de graduação da Embrapa; ²Orientador na Unifil; ³Embrapa Soja.

Introdução

O melhoramento genético deve ser visto como uma ferramenta tecnológica essencial para uma boa qualidade de vida, levando em consideração as condições que o planeta se encontra e futuramente se encontrará. (Jornal do meio ambiente, 2005).

A água constitui, aproximadamente, 90% do peso da planta, atuando em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos (Embrapa, 2001).

A necessidade de água na planta é maior principalmente em dois períodos de desenvolvimento da soja, germinação – emergência e floração – enchimento de grãos.

O Centro Nacional de Pesquisa em Soja (Embrapa Soja) em parceria com o Instituto Internacional de Pesquisas Agropecuárias do Japão, o JIRCAS Trabalham no desenvolvimento de uma variedade de soja com maior tolerância à seca. (Anuário brasileiro de Soja, 2005).

Este trabalho consiste em inserir o gene DREB isolado da planta *Arabidopsis thaliana* em cultivar de soja suscetível á seca, no caso a BR16. (Anuário brasileiro de Soja, 2005).

DREB pertence a uma família de fatores de transcrição de *Arabidopsis thaliana* conhecida como Dehydration responsive element (DREB) representado pelos fatores DREB1B, DREB1C, DREB1A (Tomashow et al., 2001). Esses fatores possuem o domínio AP2 (ap2/EREBP) se liga a sequência regulatória cis atuante de resposta a desidratação e ao frio de-

nominada de elemento DRE. (Baker et al., 1994). O elemento DRE contém uma sequência conservada que tem uma importante função como sítio de regulação da expressão de vários genes relacionados com resposta a estresses abióticos (Tamashow, 1999).

Considerando o tempo que a soja leva para reagir à escassez de água, quando ela começa a abortar flores e legumes, na variedade modificada o que se pretende é que esse prazo seja mais longo retardando a desestruturação celular e permitindo que o tempo de espera pela chuva seja maior. (Anuário brasileiro de soja, 2005)

O objetivo do trabalho foi avaliar resposta morfofisiológicas de plantas transformadas com o gene DREB1A submetidas ao déficit hídrico.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação em blocos ao acaso, com 4 blocos sendo cada tratamento no bloco representado por 3 plantas. As plantas de soja foram submetidas a diferentes condições hídricas no solo, esses divididos em 5% e 15% de umidade antes do período de enchimento de grãos da leguminosa.

Foram utilizadas a cultivar BR16, pelo fato de ser uma das cultivares mais suscetíveis a seca nos experimentos em campo e a variedade transgênica dessa cultivar, denominada de P58.

Com o intuito de analisar respostas da variedade P58, transformada com o gene DREB, quanto à expressão de tolerância a seca, foram avaliados diversos parâmetros, agrônômicos e fisiológicos e feita uma comparação dos resultados obtidos com a cultivar BR16 e a variedade P58 nas diferentes condições hídricas do solo em que as plantas foram disponibilizadas.

Entre os parâmetros avaliados se destaca a pesagem diária dos vasos com o objetivo de mantê-las com teores de água determinados para cada tratamento (5% e 15% de umidade gravimétrica).

Assim que as plantas atingiram a maturação, elas foram coletadas e transportadas para laboratório, onde foram realizados os parâmetros agrônômicos.

Entre os parâmetros fisiológicos foram realizadas medições de taxa fotossintética (aparelho LI6400), eficiência fotossintética (HANSATEC) e teor de clorofila da planta, (Spad 502, Minolta) na fase de enchimento de grãos que é considerada uma das fases mais críticas da soja em relação ao estresse hídrico.

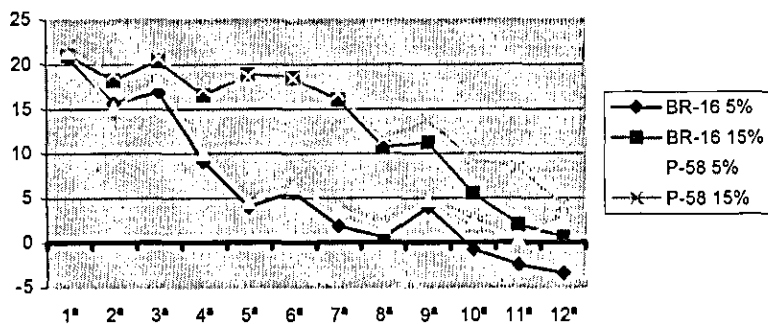
Foram realizadas doze leituras, que se estenderam do princípio do mês de março até o final do mês de abril do ano de 2006, seguindo as datas de, sete de março, treze de março, vinte e um de março, vinte e oito de março, quatro de abril, oito de abril, onze de abril, treze de abril, dezessete de abril, vinte e um de abril, vinte e quatro de abril, e vinte e sete de abril do ano de dois mil e seis.

Resultados e Discussão

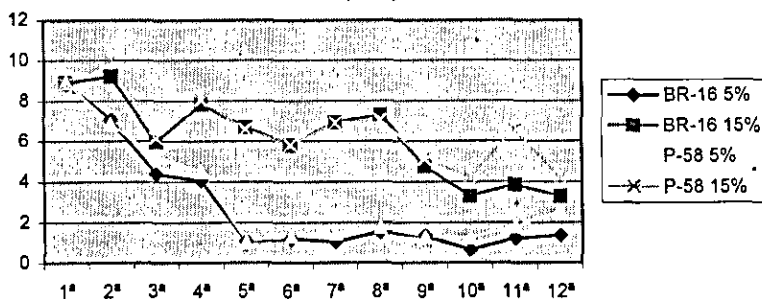
Com base nas avaliações fisiológicas, pode-se afirmar que a variedade transgênica, P58, apresentou maior taxa fotossintética do que a cultivar BR16, tanto em vasos contendo 5% de umidade de solo, como nos com 15%. A diferença fica mais nítida quando a planta atinge seus estádios finais, isso por que ela já passou pelas fases mais críticas em relação ao estresse hídrico. As plantas mais suscetíveis ao estresse hídrico, tiveram uma senescência mais acelerada, apresentando folhas secas e amareladas mais rapidamente do que as menos suscetíveis. Um fator que influenciou nessa maior taxa fotossintética da P58, foi o fato da variedade P58 apresentar maior condutância estomática do que a BR16, o que indica que a variedade transgênica manteve seus estômatos abertos em tempo maior do que a cultivar BR16.

Com isso a P58 também apresentou maior eficiência fotossintética e maior transpiração foliar.

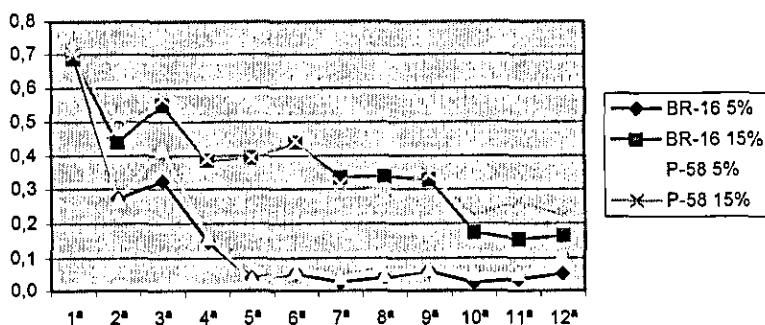
Taxa fotossintética



Taxa de transpiração



Condutância estomática



Referencias

TOMASHOW, M. F. Role of cold-responsive genes in t freezing tolerance. **Plant Physiol**, 1999.

BAKER, S. S.; WILHELM, K. S.; TOMASHOW, M. F. The 5'-region of *Arabisopsis thaliana* cor 15a has cis-elements that confer cold-, drought- and ABA- regulated gene expression. **Plant Mol. Biol.** 24: 701- 713, 1994

Tecnologia de produção em soja Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br> acesso: 27 julho 2006.

Anuário brasileiro de soja, 2005/Angela Vencato...[et al.].-Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2005..136 p.:il.

Tecnologia e desenvolvimento, disponível em: www.jornaldomeioambiente.com acesso em: 27 de julho de 2006.

Embrapa

Soja

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**